



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE MEDICINA



Tesis de doctorado

***Patogénesis de la leucemia linfática crónica:
papel de los neutrófilos en la iniciación y
progresión de la leucemia.***

Lic. Enrique Podaza

DIRECTORA: Dra. Mirta Giordano
CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dr. Angel Alonso

Laboratorio de Inmunología Oncológica
Instituto de Medicina Experimental- Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires

2017

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
1.1- LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA: GENERALIDADES Y MARCADORES PRONÓSTICOS.....	18
1.1.1 <i>Marcadores biológicos con valor pronóstico.</i>	9
1.1.2 <i>Relevancia del microambiente tumoral en la patogénesis de la LLC.</i>	12
1.1.3- <i>Infecciones en pacientes LLC.</i>	15
1.1.3.a - Alteraciones de la inmunidad innata en pacientes LLC.	15
1.1.3.b- Alteraciones de la inmunidad adaptativa en pacientes LLC.	16
1.2- NEUTRÓFILOS.....	18
1.2.a- Mecanismos dependientes de oxígeno.	19
1.2.b- Mecanismos independientes de oxígeno.....	19
1.3- TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS.	20
1.3.1- <i>Mecanismo de NETosis.</i>	22
1.3.2- <i>Implicancias patológicas de las NETs.</i>	23
1.4- NEUTRÓFILOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.	24
1.4.1- <i>Interacciones de TANs y otras células inmunes en el microambiente tumoral.</i>	27
1.4.2- <i>Neutrófilos en tumores humanos.</i>	28
1.5- LL-37: PÉPTIDO ANTIMICROBIANO Y MOLÉCULA INMUNOREGULADORA.	29
1.5.1- <i>LL-37 y microambiente tumoral.</i>	31
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y METODOS.	35
1. REACTIVOS GENERALES.	35
a. <i>Buffer Fosfato Salino (PBS).</i>	35
b. <i>Solución de Turk para el recuento de células.</i>	35
c. <i>Medio de cultivo.</i>	35
d. <i>Soluciones de Ficoll-Triosom y Dextran.</i>	35
e. <i>Buffers para Western Blot.</i>	36
2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES LLC Y DE DADORES SANOS	36
a. <i>Separación de células mononucleares y criopreservación de las muestras.</i>	36
b. <i>Aislamiento de neutrófilos.</i>	37
3. INDUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NETs.	37
4. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	38
a. <i>Análisis del proceso NETótico por microscopía confocal.</i>	38
b. <i>Análisis de colocalización entre CXCR4 y LL37.</i>	39
5. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO (IROS).	39
6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ELASTASA Y MIELOPEROXIDASA (MPO) EN NEUTRÓFILOS.	40
7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-8, IL-10 Y TGF- β POR ELISA Y ENSAYOS DE DEPLECIÓN DE CITOQUINAS.	40
8. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.	41
9. DOT BLOT PARA LA DETECCIÓN DE LL37 EN SOBRENADANTES DE CULTIVO.	42
10. ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS LLC EN RESPUESTAS A CXCL12 EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LL37.	42
11. INMUNOMARCACIÓN Y CITOMETRÍA DE FLUJO.	43

a. Anticuerpos y sondas.	43
b. Modulación de la expresión de marcadores de activación y de la apoptosis en células LLC incubadas con NETs.	43
c. Niveles de apoptosis en neutrófilos cocultivados con células leucémicas.	44
d. Internalización de ADN-CpG en células leucémicas en presencia de LL37.	44
e. Internalización de CXCR4 en células leucémicas inducida por LL37.	45
f. Evaluación del contenido intracelular de LL37 en neutrófilos.	45
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	46
RESULTADOS - PARTE I – FORMACIÓN DE NETS EN LLC.	
PUESTA A PUNTO DE LA FORMACIÓN DE NETS.	47
CAPACIDAD FORMADORA DE NETs DE NEUTRÓFILOS AISLADOS DE PACIENTES LLC.	47
ANÁLISIS DE FACTORES INTRÍNSECOS QUE PUDIERAN EXPLICAR LA MAYOR CAPACIDAD FORMADORA DE NETs DE LOS NEUTRÓFILOS LLC.	52
EVALUACIÓN DE FACTORES PLASMÁTICOS COMO AGENTES POTENCIADORES DE LA RESPUESTA NETÓTICA.	54
PAPEL DE LA IL-8 PLASMÁTICA EN EL PRECONDICIONAMIENTO DE LOS NEUTRÓFILOS PARA PRODUCIR NETs.	57
RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE NETs Y LA PROGRESIÓN DE LA LLC.	60
EFECTO DE LAS NETs SOBRE LA CÉLULA LEUCÉMICA.	63
RESULTADOS - PARTE II – NEUTRÓFILOS ASOCIADOS A TUMOR EN LLC.	
EFECTO DE LAS CÉLULAS LLC SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS NEUTRÓFILOS.	68
MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BFL-1 POR EL MEDIO CONDICIONADO LLC.	70
ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE IL-10 Y TGF-B EN LA ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA DE LAS CÉLULAS LLC SOBRE LOS NEUTRÓFILOS.	71
RESULTADOS - PARTE III –PROPIEDADES PROTUMORALES DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO LL37 EN LLC.	76
EL PÉPTIDO LL37 INHIBE LA APOPTOSIS ESPONTÁNEA DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS.	76
EL PÉPTIDO LL37 INHIBE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS INDUCIDA POR FLUDARABINA.	77
EL PÉPTIDO LL37 INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE BCL-2 E INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3. ..	78
LA ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA DE LL37 EN CÉLULAS LLC NO DEPENDE DE FPRL-1 Y P2X7R	79
INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO LL37 CON CXCR4.	80
EFECTO DEL LL37 SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA LEUCÉMICA.	83
LL37 COMO POTENCIADOR DE LA ACTIVACIÓN CELULAR INDUCIDA POR ADN-CpG.	84
NEUTRÓFILOS COMO FUENTE DE LL37.	87
DISCUSIÓN.	90
PAPEL DE LAS NETs EN LLC.	90
DIFERENCIACIÓN DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES A TANS INDUCIDA POR LAS CÉLULAS LLC.	96
EL PÉPTIDO LL37 COMO SEÑAL PROTUMORAL EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL LLC.	99
CONCLUSIONES.	104
BIBLIOGRAFÍA.	106

ABREVIATURAS.

LLC: Leucemia linfática crónica

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato (del inglés: phorbol 12-myristate 13-acetate)

DPI: Difeniliodonio

DMSO: Dimetil sulfóxido

ADN: Ácido desoxiribonucleico

MPO: Mieloperoxidasa

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés: *neutrophil extracellular traps*)

LPS: Lipopolisacárido

DHR: Dihidrorodamina

IL: Interleuquina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: *tumoral necrosis factor alpha*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (del inglés: *transforming growth factor beta*)

TAN: Neutrófilo asociado a tumor (del inglés: *tumor associated neutrophils*)

TAM: Macrófago asociado a tumor (del inglés: *tumor associated macrophage*)

NLC: Célula tipo nodriza (del inglés: *nurse like cells*)

PBS: tamón fosfato salino (del inglés: *phosphate buffered saline*)

CD: Cluster de diferenciación

NADPH oxidasa: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa

SFB: Suero Fetal Bovino

BSA: Albumina Sérica Bovina (del inglés: *Bovine Serum Albumin*)

RESUMEN.

Los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) exhiben una alta frecuencia de infecciones especialmente mediadas por bacterias extracelulares como consecuencia, al menos en parte, de alteraciones que las propias células leucémicas inducen en la respuesta inmune. Teniendo en cuenta la relevancia de los neutrófilos en estas infecciones así como la escasa o nula información reportada sobre estos leucocitos en el marco de la LLC, el objetivo de este trabajo de tesis fue investigar la interacción de los neutrófilos, en particular de las trampas extracelulares (NETs) con las células B leucémicas. Los resultados obtenidos indican que los neutrófilos de pacientes LLC tienen una capacidad incrementada de formar NETs en comparación con los neutrófilos de dadores sanos, y que los altos niveles plasmáticos de IL-8 son, en gran parte, responsables de esta mayor capacidad. Por otro lado, se encontró que las NETs inducen la activación y prolongan la sobrevivencia de las células leucémicas. Éstas, por su parte, retrasan la apoptosis de los neutrófilos a través de factores solubles aún no identificados que actúan incrementando la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-1. Las células LLC promueven además la reprogramación de los neutrófilos mediante la liberación de IL-10 y TGF- β . Estas citoquinas aumentan la expresión de CD16 y disminuyen la de CD62L, marcadores éstos que determinan un fenotipo de neutrófilos inmunosupresores. En este trabajo de tesis se evaluó también el papel del péptido antimicrobiano LL37, cuyo precursor se encuentra almacenado en los gránulos específicos de los neutrófilos. Los resultados mostraron que LL37 retrasa la apoptosis de las células B leucémicas, tanto espontánea como inducida por fludarabina e incrementa la respuesta quimiotáctica a la quimiocina CXCL12, siendo ambos efectos mediados por su interacción con el receptor CXCR4. Asimismo, las células LLC inducen la secreción de LL37 por parte de los

neutrófilos actuando en parte a través de señales de contacto célula-célula y en parte a través de factores solubles. El conjunto de resultados obtenidos pone en evidencia una interacción no descrita hasta el momento de los neutrófilos y las células B leucémicas, como así también un rol relevante del péptido LL37 en el marco de la LLC. La cuantificación de los niveles plasmáticos de LL37 y la evaluación del fenotipo de los neutrófilos en pacientes LLC podrían constituir futuros marcadores pronósticos de progresión leucémica.

Palabras claves: LEUCEMIA LINFATICA CRONICA, LL37, APOPTOSIS, CXCR4, NEUTROFILO ASOCIADO A TUMOR

ABSTRACT.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) patients exhibit a high rate of infections, especially those mediated by extracellular bacteria. This is consequence, at least in part, of alterations that the leukemic clone induces on immune cells function. Taking into account the relevance of neutrophils in this type of infections and the scarce information available about granulocytes in CLL, the aim of this thesis project was to assess the interaction of neutrophils, particularly through the release of neutrophil extracellular traps (NETs), with leukemic cells. Our results show that neutrophils from CLL patients exhibit a higher capacity to release NETs in comparison with neutrophils from healthy donors, and that an increased plasmatic concentration of IL-8 is involved as a priming factor. On the other hand, we found that NETs were capable to induce the activation and survival of leukemic cells. In addition, the results showed that CLL cells prolong neutrophil survival through the release of as-yet unidentified soluble factors, increasing the expression of the anti-apoptotic protein Bfl-1. Leukemic B cells also promote neutrophil reprogramming into the immunosuppressive type through the release of IL-10 and TGF- β , leading to the increase of CD16 expression and the reduction of CD62L membrane levels. As a second aim of this thesis project we investigated the role of the antimicrobial peptide LL37, whose precursor is found in the specific granules of neutrophils, in CLL. Results show that LL37 was capable of delaying CLL cells spontaneous and fludarabine-induced apoptosis, as well as increasing the chemotactic response to CXCL12 due to its interaction with CXCR4 expressed by leukemic cells. Additionally, CLL cells induce LL37 secretion from neutrophils through both, cell to cell contact signals and soluble factors. Altogether these results highlight a novel interaction of neutrophils with leukemic B cells and describe the protumoral function of the LL37 peptide in the hallmark of CLL.

Key words: CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA- APOPTOSIS-LL37-CXCR4- TUMOR ASSOCIATED NEUTROPHILS.

INTRODUCCIÓN.

1.1- Leucemia Linfática Crónica: generalidades y marcadores pronósticos.

La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia de mayor incidencia en adultos a nivel mundial, y su frecuencia en el hemisferio occidental llega al 25% del total de leucemias diagnosticadas(1). El rango de mayor ocurrencia se sitúa entre los 60 a 70 años, en una relación aproximada de 2:1 en el hombre respecto de la mujer.

La LLC se caracteriza por la acumulación progresiva de linfocitos B clonales con expresión de ciertos antígenos que no son frecuentes en los linfocitos B circulantes, como CD5 y CD23 (2, 3). Otra característica de las células LLC es la baja expresión de inmunoglobulina (Ig) en la superficie, que suele ser de isotipo IgM(4). En efecto, el diagnóstico de esta neoplasia se define como una linfocitosis absoluta mayor de 5×10^9 células/L dada por linfocitos de aspecto maduro e inmunofenotipo CD19⁺ CD5⁺ CD23⁺ CD20⁺ (tenue), con baja expresión de IgM de superficie(5). Su curso clínico es altamente heterogéneo, con pacientes que presentan una enfermedad indolente y estable durante muchos años, y otros en los que la enfermedad progresa rápidamente requiriendo terapia antineoplásica en forma repetida(5-7).

Existen dos sistemas de estadificación de la LLC usados y conocidos mundialmente: los estadios de Rai (8) y de Binet (9) (**Tabla 1**). En el primero, los pacientes se segregan en tres grupos de riesgo: bajo (estadio 0), intermedio (estadios I y II) y alto (estadios III y IV). De manera análoga, la clasificación Binet agrupa a los enfermos en estadios A, B y C, con aumento progresivo en la gravedad de la patología. Ambos sistemas toman en cuenta las siguientes características clínicas: presencia de linfocitos en sangre y médula ósea, linfadenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia y/o trombocitopenia.

Aun cuando estos sistemas son relevantes desde el punto de vista clínico, existen ciertos subgrupos de pacientes que, habiendo sido encuadrados dentro de un estadio particular, presentan diferencias notables en su expectativa de vida. De allí la importancia que tiene la identificación de marcadores biológicos e inmunológicos con valor predictivo que posibiliten un mejor tratamiento terapéutico.

Clasificación	Características	Sobrevida
Rai		
Estadio O	-Linfocitosis en sangre y MO únicamente	12 años
Estadio I	-Linfocitosis y linfadenopatía	
Estadio II	-Linfocitosis y esplenomegalia o hepatomegalia	7 años
Estadio III	-Linfocitosis y anemia (Hb<110 g/L)	
Estadio IV	-Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas<100.10 ⁹ /L)	< 1 año
Binet		
Estadio A	-Menos de 3 sitios infiltrados ¹ , Hb>100 g/L, plaquetas>100.10 ⁹ /L	9 años
Estadio B	-3 o más sitios infiltrados, Hb>100 g/L, plaquetas>100.10 ⁹ /L	5 años
Estadio C	-Hb<100 g/L o plaquetas < 100.10 ⁹ /L	2 años

Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de clasificación para los estadios de pacientes LLC. Rai y Binet son los sistemas de clasificación basados en parámetros clínicos y de laboratorio más difundidos. Hb: Hemoglobina, MO: médula ósea. ¹sitios infiltrados pueden ser: hígado, bazo y ganglios linfáticos inguinales, axilares y cervicales.

1.1.1 Marcadores biológicos con valor pronóstico.

Se ha demostrado claramente que la heterogeneidad de la LLC a nivel clínico se correlaciona con heterogeneidad a nivel de la célula leucémica. En el año 1994, Dighiero y colaboradores reportaron que los genes que codifican para la porción variable de la cadena pesada de la Ig (IgVH) presentan mutaciones en alrededor del 50% de los de las células leucémicas en pacientes LLC(10). Sobre la base de estas observaciones se estableció una nueva clasificación de los pacientes LLC en dos grupos de acuerdo al estatus mutacional de la IgVH: aquellos que poseen IgVH no mutadas y aquellos que poseen IgVH mutadas.

Luego del reconocimiento del antígeno específico, como consecuencia del proceso de hipermutación somática, los linfocitos B aumentan la afinidad de su receptor antigénico gracias a la introducción de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las porciones variables (VH y VL) de las inmunoglobulinas. Es por esto que la caracterización del estatus mutacional de la Ig de superficie de las células LLC permitió hipotetizar acerca del momento dentro del ciclo de vida del linfocito B en el cual se produjo la malignización de la célula. Un análisis simplificado de la situación sugeriría que en el grupo de los pacientes con IgVH no mutados, la transformación del linfocito B a célula leucémica se produjo previo al contacto con el antígeno, mientras que en el grupo de pacientes con IgVH mutados, la malignización fue posterior. Sin embargo la realidad de la célula leucémica es mucho más compleja. Al analizar con mayor detenimiento las características de las células LLC se observa que todas ellas, independientemente de la presencia o no de mutaciones en las regiones IgVH, presentan un fenotipo de linfocito B que ha sido activado por el antígeno(11). Esto sugiere que, una vez producido el encuentro con el antígeno, dependiendo de las características de esa activación antigénica, en algunos casos se favorece el proceso de hipermutación somática, mientras que en otros no. Aun no está claro, cuál o cuáles son los antígenos que podrían estar involucrados en el proceso de malignización del clon leucémico. Sin embargo, hallazgos publicados en el 2004 demuestran que la porción de las cadenas de la Ig clonal que interaccionan con el determinante antigénico es sorprendentemente similar entre distintos pacientes LLC (alrededor del 20% de los pacientes con IgVH no mutado), lo que sugiere que estas células han sido seleccionadas por un mismo antígeno o por un conjunto limitado de determinantes antigénicos, antes o durante el proceso de malignización(12-15).

Más allá de la relevancia del estatus mutacional para conocer el origen de la LLC, el mismo posee un importante valor predictivo ya que los pacientes pertenecientes al grupo

mutado o no mutado tienen una expectativa de vida significativamente diferente(16). Así, la falta de mutaciones en los genes IgVH del clon leucémico se asocia con una enfermedad más agresiva que conduce a la muerte del 50% de los pacientes 6 a 8 años después del diagnóstico, aún bajo tratamiento quimioterápico; mientras que la mayoría de los enfermos con IgVH mutadas presentan una enfermedad estable con una media de sobrevida superior a los 20 años.

Por otro lado, numerosos trabajos han demostrado que la expresión de CD38 en las células LLC es un factor pronóstico independiente de las mutaciones cuya presencia correlaciona con una enfermedad agresiva(17-20). La molécula CD38 es una ectoenzima que sintetiza componentes claves para la regulación de los niveles intracitoplasmáticos de calcio (21) y su entrecruzamiento luego de interaccionar con su ligando natural, el CD31(22), o con anticuerpos específicos induce la transducción de señales y la activación celular en linfocitos T, células NK, linfocitos B normales y las propias células LLC.

Otra molécula de membrana con valor pronóstico en LLC es CD49d, la subunidad $\alpha 4$ de la integrina $\alpha 4\beta 1$, una molécula de superficie celular cuya expresión promueve la proliferación de células LLC mediada por señales microambientales (23). Dicha molécula es utilizada para la identificación de un subgrupo de pacientes caracterizado por una enfermedad de alta progresión y una corta sobrevida (24, 25). Bulian y colaboradores en el año 2014 (26), realizaron un metaestudio analizando los datos clínicos de más de 3000 pacientes de todo el mundo con la finalidad de establecer el marcador clínico más relevante que se pudiera evaluar por citometría de flujo identificando a la molécula CD49d como el marcador más robusto a la hora de la estratificación de los pacientes. Además han demostrado que la expresión de CD49d permite la identificación de subgrupos de pacientes de mal pronóstico de manera independiente de la expresión de CD38. Teniendo en cuenta estas observaciones los autores sugieren que la evaluación de la expresión de

CD49d debe ser considerada como línea de base a la hora de establecer el pronóstico de pacientes recientemente diagnosticados. Sin embargo, en nuestro país, las guías de tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología recomiendan el uso de CD38 como marcador inmunofenotípico de progresión, siendo el análisis de CD49d opcional. Se considera de mal pronóstico cuando el paciente tiene más de un 30% de células leucémicas que expresan CD38 o más de un 30% de células que expresan CD49d.

1.1.2 Relevancia del microambiente tumoral en la patogénesis de la LLC.

La gran mayoría de las células LLC presentes en sangre periférica se encuentra en la fase G0/G1 del ciclo celular lo cual ha llevado a pensar que la acumulación del clon leucémico en la periferia se produce por defectos en la apoptosis más que por una desregulación de la proliferación celular (27, 28). Asimismo, dado que las células LLC presentan una sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (29) y tradicionalmente se las ha considerado como malas respondedoras a la estimulación con mitógenos *in vitro* (30), se las ha catalogado como linfocitos inertes que poseen una mínima o nula capacidad proliferativa y fallas intrínsecas en el proceso de muerte celular programada.

Sin embargo, otra serie de evidencias más recientes se contraponen a esta visión tradicional de la LLC. Por un lado, como se mencionó anteriormente, las células leucémicas expresan marcadores de activación similares a los que presentan los linfocitos B estimulados por el antígeno, independientemente del estatus mutacional de su inmunoglobulina, lo que sugiere que son células que ya han sido activadas a través del receptor antigénico (11, 31). Además, la longitud de los telómeros es menor en las células leucémicas en comparación a los linfocitos B normales, lo que indica que el clon leucémico ha transitado por varios ciclos de proliferación (32). De hecho, las células leucémicas con IgVH no mutadas poseen telómeros mucho más cortos que las mutadas, lo que implica una mayor historia replicativa en el grupo de pacientes de mal pronóstico

(32). Por otro lado, las células leucémicas mueren por apoptosis con relativa facilidad al ser cultivadas *in vitro*, lo que indica que no poseen fallas intrínsecas en el programa apoptótico y sugiere la existencia de factores del microambiente *in vivo* capaces de incrementar la supervivencia y favorecer la acumulación del clon leucémico(33-35).

En la actualidad la LLC ha dejado de ser considerada una enfermedad caracterizada por la simple acumulación de células inertes e inclusive se ha demostrado en estudios de marcación *in vivo* en pacientes utilizando agua deuterada, que las células leucémicas proliferan y presentan una tasa de generación más alta de lo que se pensaba, que alcanza valores de 0.1 a más del 1% del total del clon leucémico por día(36).

El conjunto de células leucémicas circulantes, que como se mencionó previamente, se encuentra en su gran mayoría arrestado en el estadio G0/G1 del ciclo celular, se mantiene e incrementa gracias al aporte de nuevos linfocitos que proliferan dentro de estructuras histológicas que reciben el nombre de *centros proliferantes o pseudofolículos* (35). Estos pseudofolículos se encuentran ubicados en médula ósea, en la pulpa blanca del bazo y en ganglios linfáticos, y se caracterizan como áreas nodulares no rodeadas por una zona de manto. Estudios inmunohistoquímicos evidenciaron que los pseudofolículos son acúmulos de células CD5⁺ Ki67⁺ rodeados por neovascularización (35). Comparando las células B presentes en los pseudofolículos con aquellas presentes en los centros germinales convencionales, las primeras expresan altos niveles de CD20, CD23 y Bcl-2 y no expresan CD10 ni Bcl-6. Sin embargo, ambos grupos de células B comparten la expresión de survivina, la cual controla la apoptosis y participa en la progresión del ciclo celular.

Los pseudofolículos constituyen verdaderos nichos de supervivencia para las células leucémicas. En ellos pueden observarse acúmulos de células LLC proliferantes (Ki67⁺) en íntimo contacto con linfocitos T CD4⁺ activados, células estromales, células NK, células endoteliales, células dendríticas foliculares y células de estirpe mieloide tipo nodriza,

también llamadas *Nurse-like cells* (NLC). Estas últimas se destacan por su capacidad productora de numerosos factores solubles de vital importancia para la sobrevivencia de las células leucémicas tales como CXCL12, CXCL13, BAFF, APRIL, y también de distintas interleuquinas (37). Cuando las células leucémicas son purificadas y cultivadas *in vitro* exhiben una apoptosis espontánea alta que se revierte al ponerlas en contacto con células como las NLC, linfocitos T CD4⁺ activados o células estromales (38). Asimismo el agregado de citoquinas como IL-4, IFN γ o IFN de tipo I al medio de cultivo de células LLC puras prolonga su sobrevivencia(39). En conjunto, estas observaciones ponen de manifiesto la relevancia del microambiente tumoral en el mantenimiento del clon leucémico (Fig.1).

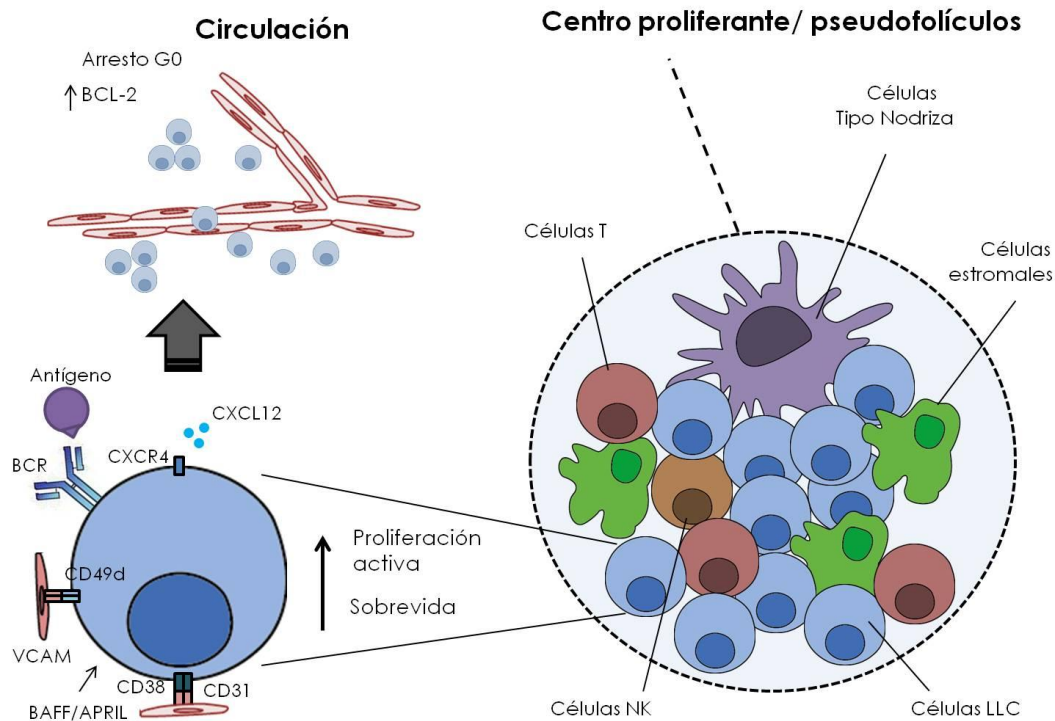


Figura 1. Mantenimiento del pool circulante desde los centros proliferantes. En la figura se ilustran los centros proliferantes donde las células LLC reciben una gran cantidad de señales estimuladoras de distintos tipos celulares, las cuales inducen la sobrevivencia y la proliferación del clon leucémico. Una vez que el clon leucémico abandona los centros proliferantes las células quedan arrestadas en la fase G0/G1 del ciclo celular y se mantienen viables gracias a la expresión sostenida de BCL-2.

1.1.3- Infecciones en pacientes LLC.

Las infecciones persisten como la principal causa de morbi-mortalidad de pacientes LLC. Hasta un 80 % de los pacientes padece al menos una complicación infecciosa durante el transcurso de la enfermedad. Se estima que alrededor de un 60% de las muertes de pacientes LLC se encuentra asociada a infecciones(40). Esta alta tasa de infecciones no se da únicamente en aquellos pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico, donde por acción de las drogas se induce un estado de inmunosupresión, sino que ocurre también en pacientes libres de tratamiento. En estos últimos la principal causa de la alta incidencia de infecciones es la desregulación del sistema inmune, la cual constituye una de las características principales de la LLC desde etapas iniciales empeorando con el progreso de la enfermedad (40).

Las infecciones más frecuentes en pacientes libres de tratamiento son aquellas que afectan el tracto respiratorio y las vías urinarias, generalmente causadas por bacterias (67%) y en menor medida por virus (25%) u hongos (7%) (40, 41). *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenza* son los principales patógenos subyacentes a las infecciones del tracto respiratorio mientras que *Escherichia coli* es el agente más comúnmente implicado en las infecciones del tracto urinario (41).

1.1.3.a - Alteraciones de la inmunidad innata en pacientes LLC.

Numerosos defectos cuantitativos y cualitativos han sido descritos en la inmunidad innata y adaptativa de los pacientes LLC desde etapas muy tempranas de la enfermedad (40, 41). Se han observado niveles reducidos de algunas proteínas del complemento, particularmente entre los componentes C1-C4. Estas deficiencias se asocian con una menor capacidad para opsonizar bacterias patogénicas con C3b contribuyendo al mayor riesgo de infección(42). De manera adicional, esta discapacidad en la actividad del

complemento puede limitar la acción terapéutica de aquellos anticuerpos cuyo mecanismo depende de la actividad citotóxica del mismo (43).

En relación a la funcionalidad de los neutrófilos se han descrito un número de deficiencias cualitativas que incluyen una fagocitosis ineficiente de bacterias no opsonizadas y una respuesta quimiotáctica reducida frente a C5a (44).

Curiosamente, la cantidad de monocitos circulantes se encuentra incrementada en alrededor de un 60% de los pacientes LLC pero estas células poseen un fenotipo CD14⁺ CD16⁺ “no clásico” y un perfil de expresión génica asociado con inmunosupresión (45). Asimismo, se han reportado diversas deficiencias enzimáticas entre ellas β -glucuronidasa, lisozima y mieloperoxidasa (40), todas ellas relacionadas con una incapacidad de montar respuestas inflamatorias adecuadas en respuesta a patógenos (45, 46).

Con respecto a las células natural killer (NK) también se encuentran incrementadas en la circulación de los pacientes LLC pero poseen ciertos defectos funcionales (47) incluyendo una actividad citotóxica limitada, posiblemente relacionada con una expresión disminuida del correceptor NKG2D(48).

1.1.3.b- Alteraciones de la inmunidad adaptativa en pacientes LLC.

Los pacientes LLC poseen una marcada disfunción de la respuesta inmune adaptativa (40, 41). Desde etapas tempranas de la enfermedad se manifiestan alteraciones dentro del repertorio de células T, haciéndose más evidentes a medida que la enfermedad progresa. Curiosamente, el número absoluto de células T CD4⁺ y CD8⁺ se encuentra incrementado desde etapas tempranas de la enfermedad, aunque el aumento relativamente mayor de la población CD8 conduce a la inversión de la relación CD4:CD8 (49). Los mecanismos que subyacen a este incremento de células T en sangre periférica se desconocen pero pueden relacionarse con una movilización incrementada desde los

tejidos linfáticos secundarios, o con un incremento en el número absoluto de células T por proliferación. Quizás la explicación más interesante para la expansión de la respuesta inmune adaptativa en la fase temprana de la LLC sería que esto representa una respuesta inmune específica, aunque ineficiente, contra las propias células leucémicas. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido demostrar una respuesta antígeno-específica contra las células LLC *in vitro*.

Además de las alteraciones a nivel cuantitativo, las células T CD4⁺ y CD8⁺ exhiben también defectos a nivel funcional. Particularmente, la respuesta mediada por células T CD4⁺ (50). Estas células poseen una expresión génica diferencial respecto a las células T CD4⁺ presentes en un dador sano de edad comparable (51). Los genes afectados incluyen en particular aquellos involucrados en la funcionalidad del citoesqueleto (51). Estos defectos se traducen en una incapacidad para formar una sinapsis inmunológica apropiada con las células presentadoras de antígeno como resultado de defectos en la polimerización de la actina (52), impidiéndose de esta forma la correcta activación de las células T.

Los defectos funcionales de las células T son inducidos, en parte, por la expresión aberrante de ligandos inhibitorios sobre las células LLC, particularmente PD-L1 (CD274)(53). El correspondiente receptor de PD-L1, PD-1 (CD279), es el receptor inhibitorio más importante asociado con células T exhaustas, un estado de nula o baja capacidad de respuesta causado normalmente por infecciones crónicas (54-57). La unión de PD-1 con PD-L1 o PD-L2 reprime la señalización a través del TCR e inhibe la proliferación y la motilidad celular (58, 59).

Las células T CD8⁺ de los pacientes LLC exhiben, también, ciertos indicios de agotamiento, tales como la expresión aumentada de PD-1, pero sin embargo, existen datos contradictorios en relación al impacto de este fenotipo sobre la funcionalidad de

estas células (60, 61). En cualquier caso, las evidencias indican claramente que los linfocitos T de los pacientes LLC no funcionan en forma adecuada.

El mayor parámetro clínico que correlaciona con el riesgo de infección en pacientes LLC es la hipogammaglobulinemia(40), que no parece diferir entre los subgrupos de pacientes con IgVH mutado y no mutado (41, 62). Los niveles séricos de al menos un isotipo de Ig se encuentran disminuidos en la mayor parte de los pacientes en fases iniciales de la LLC (63, 64). La severidad se incrementa con la progresión de la enfermedad, afectando a todas las clases de Ig (IgG, IgA, IgM), con un marcado descenso de las subclases IgG3 e IgG4 (63-65). Se ha observado una correlación directa entre niveles bajos de IgG e IgA y el incremento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes durante infecciones causadas por bacterias comunes, mientras que la reducción de los niveles de IgM parecen no influenciar el riesgo de infección(64).

Finalmente cabe señalar que estudios retrospectivos documentaron una asociación entre el riesgo de infección y el estatus mutacional de la IgVH(66, 67). En un estudio con una cohorte de 231 pacientes, aquellos con IgVH no mutado presentaron un incremento en la morbi-mortalidad ocasionada por infecciones en comparación con aquellos individuos con IgVH mutado(67).

1.2- Neutrófilos.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la circulación y son las primeras células en ser reclutadas de manera masiva a los focos inflamatorios. Estas células tienen un papel fundamental en las infecciones mediadas por bacterias extracelulares y hongos. El desarrollo de los neutrófilos comienza en la médula ósea; donde se generan aproximadamente $1-2 \times 10^{11}$ células por día y la producción de los mismos aumenta durante periodos de infección. En el contexto inflamatorio los neutrófilos se extravasan del

torrente sanguíneo al tejido infectado donde reconocen a los microorganismos invasores y luego mueren por apoptosis(68, 69).

Además de poseer una alta capacidad fagocítica, los neutrófilos cuentan con una notable diversidad de mecanismos con elevado potencial microbicida. Estos mecanismos pueden dividirse en dos grandes grupos según dependan o no de la producción de oxígeno(70).

1.2.a- Mecanismos dependientes de oxígeno.

Una estructura crucial con la cual cuentan los neutrófilos para desarrollar su función microbicida es un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que comprende componentes citosólicos y componentes asociados a membrana. Cuando la célula es estimulada por agonistas proinflamatorios, los componentes citosólicos y de membrana se asocian iniciando el llamado “*estallido respiratorio*”. Al activarse la NADPH oxidasa se generan grandes cantidades de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), entre ellos, anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales de hidroxilo ($-OH$) y ácido hipocloroso ($HClO$). Este último se forma en presencia de cloro (Cl) en una reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO).

Estos agentes son liberados en los fagosomas, donde oxidan componentes críticos de lípidos y proteínas microbianas. Asimismo los IROs son liberados en el citosol donde alteran el estado redox de la célula y oxidan su contenido incluyendo proteínas y lípidos, modificando su función. En circunstancias patológicas los IROs pueden ser liberados hacia el medio extracelular, donde pueden resultar responsables del daño de los tejidos circundantes y de la exacerbación de la inflamación.(71)

1.2.b- Mecanismos independientes de oxígeno.

Los neutrófilos son células dotadas de una elevada complejidad celular, dada no solo por su núcleo polilobulado, sino también por la gran diversidad de gránulos citoplasmáticos.

Las enzimas y proteínas presentes en estos gránulos son las responsables de mediar los mecanismos microbicidas independientes del oxígeno. Los gránulos contienen distintas proteínas, péptidos y enzimas hidrolíticas, tales como catelicidinas, elastasa, lactoferrina y MPO, entre otras, para destruir a los microorganismos invasores(72).

1.3- Trampas Extracelulares de Neutrófilos.

En el año 2004 Zychlinsky y colaboradores describieron por primera vez un nuevo mecanismo por el cual los neutrófilos eran capaces de capturar y eliminar microorganismos. Este mecanismo consiste en la formación de redes extracelulares constituidas principalmente por fibras de cromatina recubiertas de proteínas y péptidos granulares. Estas estructuras reciben el nombre de trampas extracelulares, conocidas como NETs (por sus siglas en inglés: *Neutrophil Extracellular Traps*)(73).

Lejos de ser una serie de eventos aleatorios, el proceso de formación de NETs, denominado NETosis, constituye un mecanismo de muerte celular programada distinto de la apoptosis. En la apoptosis, los neutrófilos conservan la cromatina condensada y el núcleo se fragmenta, sin que se rompa la envoltura nuclear, exhibiéndose también la vacuolización citoplasmática. Las organelas en el citoplasma se mantienen intactas. En la NETosis, en cambio, la envoltura nuclear se desintegra, al igual que las membranas granulares, permitiendo la mezcla del material nuclear con el citoplasmático, las membranas internas se pierden y las organelas citoplasmáticas desaparecen por completo. Además, la fragmentación del ADN no se observa en la NETosis(74) (Fig. 2).

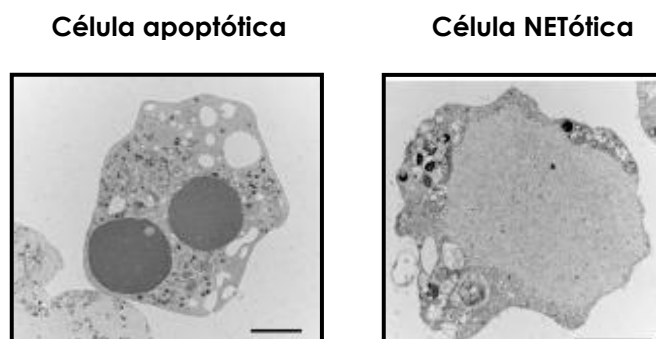


Figura 2. Diferencias morfológicas entre apoptosis y NETosis. Se exhiben imágenes adquiridas por microscopía electrónica que muestran las diferencias morfológicas de ambos tipos de muerte celular. Se observa una gran cantidad de vesículas dentro de las células apoptóticas y un núcleo fragmentado con cromatina muy condensada. Para el caso de las células NETóticas no se observan membranas internas, el contenido nuclear no se diferencia del citoplasmático sino que se encuentran mezclados antes de la ruptura de la membrana plasmática. Asimismo se muestra la mayor expansión celular en el caso de la célula NETótica. Las barras indican 3µm. Adaptada de Fuchs et.al (74).

La NETosis puede desencadenarse frente a diversos estímulos, tanto de origen microbiano como estímulos químicos o de inflamación estéril. Se ha descrito la inducción de NETosis por microorganismos como *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*, entre otros (75). Asimismo las NETs pueden producirse en respuesta a estímulos químicos como el ácido forbol mirístico (PMA) o los ionóforos de calcio, frente a estímulos inflamatorios estériles como los cristales de urato monosódico (MSU) como así también en respuesta a las citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-8 (76-78).

El mecanismo por el cual se induce la NETosis parece depender del estímulo inductor. Se ha observado que con la mayoría de los estímulos se requiere la producción previa de IROs para desencadenar el proceso de NETosis. Tal es el caso de agonistas como el PMA o los cristales de urato monosódico. Sin embargo, también se han descrito otros

estímulos en el que el proceso de NETosis parece ser independiente de la producción de IROs, como ocurre con el ácido úrico, la ionomicina o algunas bacterias(79).

1.3.1- Mecanismo de NETosis.

En estado de reposo el ADN se encuentra empaquetado alrededor de un núcleo conformado por un octámero de histonas (que incluye a las histonas H3, H2B, H2A y H4) formando nucleosomas. Esta disposición es la que permite que la cromatina posea un alto grado de condensación. Durante la NETosis, tiene lugar un tipo particular de modificación postraduccional que favorece la descondensación de la cromatina, esta modificación es la citrulinación. La citrulinación es mediada por enzimas de la familia de las peptidil deaminasas (PADs), que se encargan de convertir por desaminación al aminoácido arginina (Arg) de diversas proteínas en citrulina (Cit) (80). Esta descondensación es la que permite que actúen sobre la cromatina las enzimas elastasa y MPO. En los neutrófilos en reposo la elastasa y la MPO se hallan en los gránulos azurófilos. Tras la activación celular por estímulos que inducen NETosis, estas enzimas se translocan al núcleo. Esto ocurre, en general, de manera posterior a la activación de la NADPH oxidasa y a la consecuente producción de IROs. De hecho, se ha demostrado que inhibidores farmacológicos de esta enzima como es el caso del difenileniodonio (DPI), inhiben la NETosis en respuesta a PMA, bacterias, glucosa oxidasa o MSU. No se ha dilucidado completamente el mecanismo por el cual la elastasa y la MPO se translocan al núcleo, pero se postula que la producción de IROs podría promover su disociación de la matriz de proteoglicano permitiendo que escapen de los gránulos y se movilicen hasta el núcleo. Una vez allí, la elastasa degradará a las histonas aumentando aun más la descondensación de la cromatina. La MPO se une a la cromatina en etapas más tardías del proceso, colaborando cooperativamente con la elastasa en la descondensación de la

misma. Luego de la descondensación y de la asociación de las proteínas específicas, tiene lugar la ruptura celular y la liberación de las NETs al medio extracelular.

En el caso de estímulos que no requieren de los IROs, como la ionomicina, el mecanismo desencadenante de la NETosis podría involucrar la movilización de calcio. De hecho, en respuesta a este ionóforo de calcio se ha demostrado que los inhibidores de la NADPH oxidasa no inhiben la NETosis, mientras ésta sí se ve afectada por el agregado de quelantes de calcio que impiden la activación de PAD4.

Un resumen de los eventos moleculares implicados en la formación de NETs se ilustra en la Figura 3.

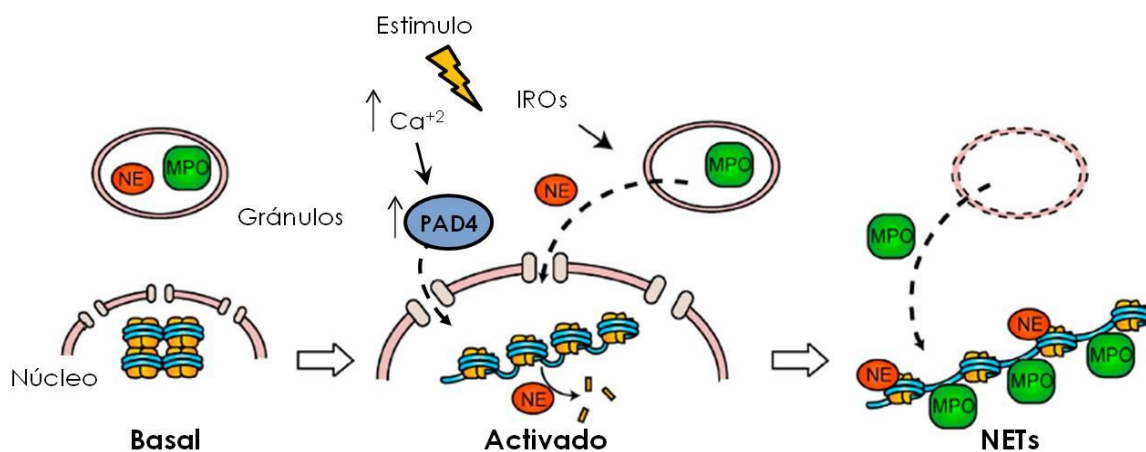


Figura 3. Mecanismos moleculares implicados en la formación de NETs. Se ilustran los diferentes eventos moleculares que dan lugar a la generación de NETs. En respuesta a distintos estímulos se generan IROs que favorecen el escape de la elastasa (NE) al núcleo la cual inicia el clivaje de las histonas favoreciendo la descondensación de la cromatina. En paralelo, en respuesta a los IROs o a concentraciones crecientes de calcio citoplasmático aumenta la expresión de la enzima PAD4, la cual induce la citrulinación de las histonas contribuyendo a la descondensación de la cromatina. En un último paso la MPO se transloca al núcleo y favorece la formación de las NETs.

1.3.2- Implicancias patológicas de las NETs.

Las NETs fueron descritas inicialmente como eficientes mecanismos microbicidas, sin embargo, durante la última década diversos estudios evidencian su participación activa en una gran cantidad de patologías como trombosis (81), enfermedades autoinmunes (82, 83), enfermedades autoinflamatorias de origen genético (84), patologías asociadas a

inflamación (78, 85), desórdenes metabólicos(86), enfermedades pulmonares(87), fibrosis (88) y cáncer (89, 90).

Independientemente del estímulo que gatille su formación, las NETs están constituidas por ADN, Histona H-3 citrulinada, elastasa y MPO, siendo estos tres componentes proteicos los más frecuentemente utilizados para su detección. Sin embargo, evidencias recientes demostraron que los componentes proteicos de las NETs varían dependiendo del ambiente inflamatorio específico en el que se formen (91). Por ejemplo, la interleuquina 1 β (IL-1 β) es particularmente notable en gota (78), interleuquina 17 (IL-17) en psoriasis (92) y fibrosis pulmonar (88), el péptido antimicrobiano LL-37 en lupus eritematoso sistémico (LES) (93) y la PAD4 en artritis reumatoidea (94).

1.4- Neutrófilos en el microambiente tumoral.

En el contexto del cáncer el sistema inmune cuya función básica es proteger al organismo de las infecciones sufre un cambio hacia la inmunosupresión, proceso durante el cual las células tumorales polarizan a las distintas poblaciones de leucocitos infiltrantes hacia un fenotipo promotor del crecimiento tumoral(95).

Los neutrófilos constituyen una parte significativa del infiltrado inflamatorio en muchos tipos de cáncer(96-98) y los altos niveles de neutrófilos intratumorales se han asociado con mal pronóstico (99), ya que promoverían las metástasis (100, 101) y la angiogénesis(102). En contraste, otros estudios han reportado efectos antitumorales mediados por neutrófilos, demostrando que estos son capaces de exhibir efectos citotóxicos directos sobre las células tumorales (103) y de impedir la metástasis(104). Aunque el rol protumoral versus antitumoral de los neutrófilos en cáncer sigue siendo objeto de debate, datos crecientes obtenidos de modelos animales y de estudios humanos demuestran que los neutrófilos asociados a tumor (TANs) juegan un rol importante en el desarrollo tumoral.

La plasticidad fenotípica de los TANs descrita en respuesta a señales presentes en el microambiente tumoral ha sido descrita previamente en otras células inmunes de estirpe mieloide como los macrófagos asociados a tumor (TAMs)(105). Numerosas publicaciones utilizando modelos murinos de cáncer demostraron que los neutrófilos pueden diferenciarse en un fenotipo protumoral (N2) en presencia de TGF- β (106) o a un fenotipo antitumoral (N1) mediante el bloqueo de TGF- β o por la presencia de IFNs de tipo 1(107, 108). El TGF- β previene la producción de IROs, especies reactivas de nitrógeno (IRNs) e IL-1 β por parte de los TANs. En contraste, la inhibición de la vía de señalización gatillada por el TGF- β confiere un perfil antitumoral a los neutrófilos, el cual se asocia con una alteración del perfil de citoquinas y quimiocinas producidos, como por una elevada capacidad de infiltrar el tejido tumoral(106, 108). Por su parte, la presencia de IFNs de tipo I favorece el desarrollo de TANs N1 con una elevada actividad citotóxica, alta capacidad de generar NETs, alta expresión de ICAM-1 y de TNF- α (107).

Otras citoquinas tales como G-CSF, IFN- γ , TNF- α e IL-8 también promueven cambios en las características fenotípicas y funcionales de los neutrófilos, y favorecen el reclutamiento de subpoblaciones específicas de los mismos (104, 109-111).

El estudio de TANs aislados de tumores murinos tempranos demostró que los mismos exhiben mayor capacidad citotóxica contra células tumorales respecto a los aislados de tumores establecidos(112). Estas observaciones llevaron a la hipótesis de una transición de N1 a N2 durante la progresión tumoral. Además de cambios en el estado de activación celular, Mishalian y colaboradores(112) demostraron que en etapas tempranas del proceso neoplásico, los TANs se localizan en la periferia del tumor, mientras que en etapas avanzadas se encuentran intercalados entre las células tumorales.

Se ha visto además que los neutrófilos reclutados al tejido tumoral secretan activamente quimiocinas y citoquinas, capaces de incrementar no solo su propio reclutamiento sino

también el reclutamiento, la activación y polarización hacia un fenotipo protumoral de otras células inmunes(113). Fridlender y colaboradores demostraron que los TANs exhiben un perfil transcriptómico completamente diferente al que exhiben las células mieloides supresoras granulocíticas y los neutrófilos “naive” derivados de médula ósea (114). Además, el mismo grupo describió numerosas diferencias en los genes expresados por las poblaciones N1 y N2 que incluyen genes relacionados con la organización del citoesqueleto, fagocitosis, respuesta inmune y quimiotaxis (108). De hecho, una de las diferencias más significativas halladas entre ambos grupos es su perfil de citoquinas y quimiocinas, lo cual apoya la noción de que los TANs poseen un rol fundamental en el reclutamiento de leucocitos al microambiente tumoral como así también en el balance de estados de activación-supresión del sistema inmune en cáncer.

Los TANs N1 expresan altos niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α , junto con varias quimiocinas para células T y macrófagos (CXCL10, CCL7, CCL2 y CCL3). CCL17 y CXCL14 son las dos quimiocinas con el menor nivel de expresión en TANs N1 en comparación con los N2. De hecho, se ha demostrado una secreción activa de CCL17 por parte de los TANs N2, la cual es seguida de un activo reclutamiento de células T regulatorias al microambiente tumoral. CXCL14, por otro lado, posee actividad quimiotáctica para macrófagos activados, células dendríticas inmaduras y células NK. En los análisis transcriptómicos previamente mencionados también se observó que los TANs N2 pueden expresar TGF- β , IL-6 e IL-23, una combinación de citoquinas sugeridas como promotoras de las respuestas Th17.

En conjunto, todas estas observaciones refuerzan el concepto de que los TANs constituyen una fuente activa de citoquinas y quimiocinas dentro del tumor actuando como orquestadores de la inmunidad innata y adaptativa en el microambiente tumoral.

1.4.1- Interacciones de TANs y otras células inmunes en el microambiente tumoral.

La existencia de múltiples *crosstalks* entre los TANs y otros tipos celulares infiltrantes en el tejido tumoral han sido descriptas como factores promotores de la evasión a la inmunovigilancia (Fig. 4).

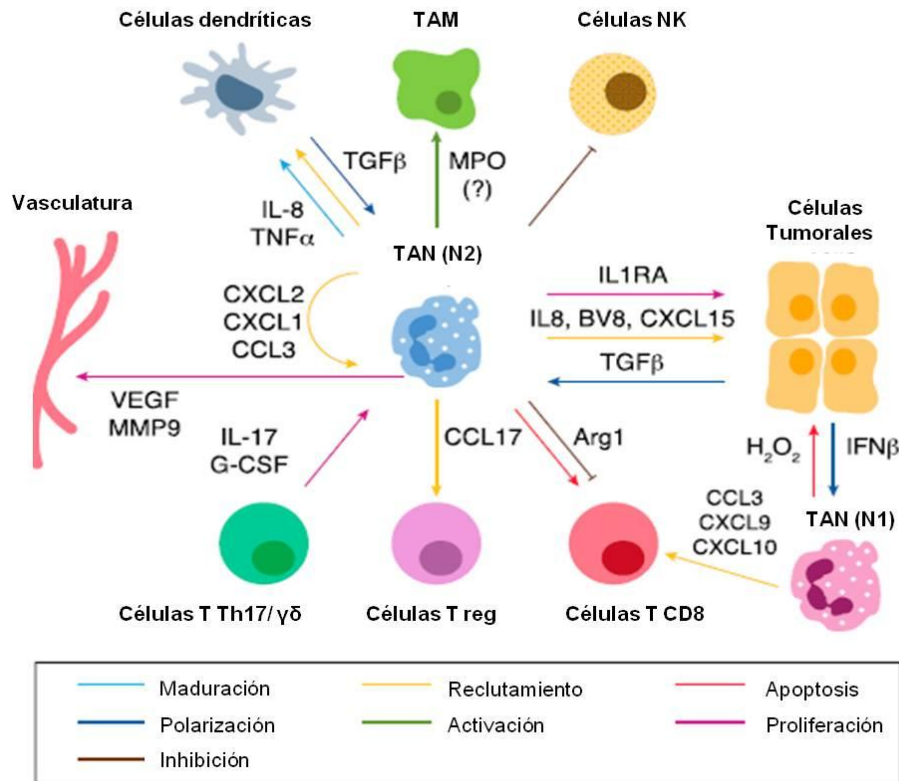


Figura 4: Interacciones de TANs y otras células inmunes en el microambiente tumoral. En la figura se ilustra la compleja red de interacciones de los TANs con distintos componentes del sistema inmune. Se resaltan los factores solubles que intervienen en cada interacción como así también los efectos biológicos resultantes (indicado por el color de las flechas).

Una gran cantidad de estudios realizados en los últimos años, la mayoría en modelos murinos de cáncer, han explorado las interacciones de los TANs y las células T. Los neutrófilos y las células T pueden modular sus funciones mutuamente a diversos niveles, ya sea en una manera dependiente de contacto o mediante la liberación de citoquinas. En el microambiente tumoral, las células Th 17 y la IL-17 producida por ellas promueven el crecimiento tumoral y la movilización de neutrófilos(115), la inducción de la secreción de

IL-8 por parte de las células epiteliales y también la expresión de G-CSF, induciendo la movilización y el reclutamiento de células mieloides inmaduras.

Las células $\gamma\delta$ productoras de IL-17 en ratones portadores de tumores, promueven la expansión de los neutrófilos y su polarización dependiente de G-CSF(116). Frilender y colaboradores reportaron que dependiendo de su perfil, los TANs pueden reclutar distintos subgrupos de células T: los N1 tienden a reclutar linfocitos T CD8⁺ mientras que los N2 favorecen el reclutamiento de células T regulatorias (106, 117).

Además de afectar la funcionalidad de distintos subgrupos de células T, como se muestra en detalle en la Figura 4, los TANs modulan la funcionalidad de otras células del infiltrado tumoral (113). Por ejemplo, activan a las células dendríticas mediante señales célula a célula y a través de la secreción de TNF- α , promoviendo la regresión tumoral de una manera IL-12 dependiente (118). Asimismo, inhiben la función de las células NK y la secreción de INF- γ por parte de las mismas, favoreciendo el desarrollo de metástasis(119), y activan y reclutan macrófagos a través de la secreción de IL8, TNF- α y mieloperoxidasa(120). Sin embargo, aún no se conocen en detalle cómo es la interacción TANs-TAMs en el microambiente tumoral.

1.4.2- Neutrófilos en tumores humanos.

La información que existe respecto a neutrófilos en cáncer humano es aun limitada. Estudios histológicos realizados en distintos tipos de tumores demostraron que los altos niveles de neutrófilos intratumorales se asocian con un mal pronóstico, particularmente en pacientes con carcinoma de células renales, melanoma, cáncer colorectal y cáncer de cabeza y cuello(99). Asimismo, la magnitud de neutrófilos infiltrantes correlaciona con el grado de desarrollo de gliomas humanos (121) y con tumores pancreáticos agresivos

(122). Por otra parte, muchos pacientes con melanoma metastásico avanzado muestran niveles altos de neutrófilos en circulación y esto se asocia con peor pronóstico (123).

En contraste, se reportó que un mayor número de neutrófilos circulantes en tumores gástricos se asocia con un pronóstico favorable(124). Los mecanismos por los cuales se induce esta neutrofilia en pacientes oncológicos no se conocen con claridad, sin embargo algunas citoquinas secretadas por las células tumorales podrían contribuir a este fenómeno y a la promoción de las propiedades supresoras adquiridas por los neutrófilos circulantes en este contexto(125).

1.5- LL-37: péptido antimicrobiano y molécula inmunoreguladora.

El LL-37 es un péptido catiónico de 37 aminoácidos que se genera por el clivaje extracelular de la porción C-terminal de la proteína catelecidina (hCAP18) (126). Su carga positiva le permite asociarse a membranas fosfolipídicas cargadas negativamente como las de las bacterias y de allí su capacidad microbiciida. Las membranas plasmáticas asociadas a colesterol, como las de los mamíferos, se encuentran mejor protegidas de la actividad citotóxica de LL-37, aunque a altas concentraciones también son susceptibles a la misma. Si bien fue originalmente caracterizado como un péptido expresado constitutivamente en neutrófilos, el LL-37 también es producido por varios otros tipos celulares, como macrófagos, células epiteliales y células NK(93).

Además de su papel microbiciida, el péptido LL37 posee propiedades inmunregulatorias tanto sobre células de la inmunidad innata como de la adaptativa, basadas fundamentalmente en su capacidad para inducir la secreción de diversas citoquinas y quimiocinas (93). Así por ejemplo, induce la secreción de IL-1 β e IL-10 en monocitos y de TNF α en distintas líneas macrofágicas (127, 128). En mastocitos, el LL-37 gatilla la degranulación con la consecuente liberación de histamina(129). Las células epiteliales además de secretar LL-37 responden a su estimulación secretando IL-6 e IL-1 β .

Se han reportado varias moléculas de membrana con las que el péptido puede interactuar, siendo las mejor caracterizadas el receptor purinérgico P2X7 (127) y el receptor para péptidos formilados FPRL1 (previamente conocido como *formyl peptide receptor-like 1*)(130). Por ejemplo el aumento en la secreción de IL-8 en fibroblastos y de leucotrieno B4 en macrófagos inducida por LL-37 se inhibe significativamente con antagonistas del receptor P2X7R (93). Por otra parte, la inhibición de la apoptosis de neutrófilos mediada por LL-37 se bloquea en forma parcial con antagonistas de FPRL1 y de P2X7R (129, 131). En la figura 5 se ilustran algunas de las funciones inmunoregulatoras mas relevantes del péptido LL37.

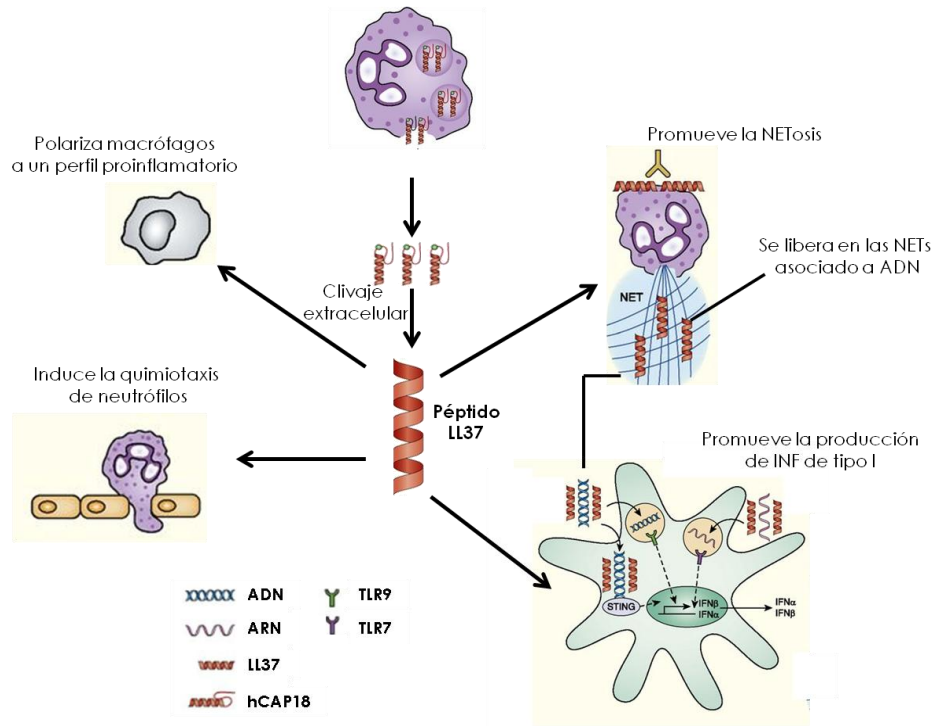


Figura 5. Efectos inmunomoduladores del péptido LL37. En la ilustración se indican algunos de los efectos inmunomoduladores inducidos por el péptido LL37.

Además de su rol versátil como molécula inmunoregulatoria, el LL37 es capaz de modular la migración celular. Es así que el LL-37 cumple un doble papel en el reclutamiento de leucocitos a sitios inflamados ya que no sólo es quimiotáctico de neutrófilos *per se*(132), si

no que además estimula la producción de varias quimiocinas, siendo las más importantes IL-8, CCL2, CCL4 y CXCL1, secretadas por monocitos, macrófagos, células endoteliales y/o fibroblastos (93, 126, 133).

Cabe destacar que el LL-37 favorece la migración de precursores hematopoyéticos inducida por CXCL12. Esta quimiocina cumple un papel central en LLC ya que por un lado induce la migración de las células leucémicas y los linfocitos T que colaboran con ellas a los centros de proliferación en los tejidos linfáticos, y por otro lado actúa como un potente factor de estimulación y supervivencia de las células LLC (47, 134). Más aún, los inhibidores de quinasas, como el Ibrutinib, que están revolucionando la terapia de la LLC interfieren con la interacción de las células LLC y su entorno protector ya que bloquean la señalización por CXCR4, el receptor para CXCL12 y otros receptores para quimiocinas(135). El grupo de Ratajczak demostró en 2012 que el LL-37 aumenta la respuesta quimiotáctica de precursores hematopoyéticos hacia CXCL12 favoreciendo la incorporación de CXCR4 a *lipid rafts* (136). Es interesante señalar que estos autores encuentran niveles elevados de ARNm para LL-37 en células de médula ósea de ratones expuestos a irradiación antes de un trasplante. Estos hallazgos sugieren que LL-37 puede ser liberado en respuesta a un proceso de inflamación estéril favoreciendo la migración de células que expresen CXCR4 a los tejidos linfáticos.

1.5.1- LL-37 y microambiente tumoral.

La presencia de LL-37 en tumores humanos fue reportada por primera vez en 2005 por Heilborn y colaboradores quienes encontraron una fuerte expresión del péptido en células de carcinoma de mama(137). Posteriormente se describió la presencia de LL-37 en biopsias de adenocarcinomas de pulmón(138). En ambos trabajos se reporta que el cultivo *in vitro* con LL-37 exógeno induce la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama o pulmón. En contraposición con estos trabajos, recientemente se han publicado

varios artículos en los que se demuestra que la fuente de LL-37 en el microambiente de ciertos tumores no son las células transformadas sino los macrófagos asociados a tumor. En biopsias de cáncer de colon, Li y colaboradores encontraron la sobreexpresión de LL-37 en los macrófagos infiltrantes del tejido tumoral pero no en las secciones correspondientes a mucosa normal(139). El cultivo *in vitro* de macrófagos diferenciados a partir de monocitos de dadores sanos en presencia de M-CSF (perfil M2) con células de cáncer de colon aumentó la expresión de LL-37 en los macrófagos indicando que las células tumorales son capaces de regular la síntesis del pro-péptido (catelicidina) en las células mieloides. En un modelo murino de cáncer de colon los autores demuestran que LL-37 promueve el crecimiento tumoral activando la vía PTEN/PI3K/Akt/Wnt/ β catenina. Por su parte, Sainz y colaboradores encontraron que LL-37 se sobreexpresa en macrófagos asociados a tumores en biopsias de adenocarcinoma pancreático ductal(140). También en este caso las células tumorales juegan un papel crucial en la expresión de LL-37 ya que factores producidos por el tumor, en particular TGF β , inducen la secreción de LL-37 al medio. A su vez, LL-37 favorece la proliferación y migración de las células malignas a través de FPRL1 y P2X7R. Los resultados son corroborados en un modelo de cáncer de páncreas en el cual los ratones reconstituidos con médula ósea proveniente de animales *knockout* para catelicidina desarrollan tumores más pequeños. Tomados en conjunto, estas publicaciones muestran una clara actividad pro-tumoral de LL-37 expresado por TAMs y señalan que las células malignas no son ajenas a esta expresión sino que, por el contrario, liberan factores que inducen la síntesis y/o liberación de LL-37 al medio extracelular.

Sin embargo, no todas las publicaciones coinciden en los efectos protumorales de LL-37 secretado por TAMs. Bruns y colaboradores reportaron que los macrófagos presentes en ganglios linfáticos de pacientes con linfoma de Burkitt expresan niveles bajos de las

enzimas implicadas en el metabolismo de la Vitamina D y del receptor para el metabolito activo, 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25 VD3)(141). La relevancia de la Vitamina D en relación a LL-37 se debe a que el receptor de Vitamina D está implicado directamente en la transcripción del gen de catelicidina. En el trabajo nombrado, los autores demuestran que los macrófagos asociados al linfoma de Burkitt no son citotóxicos contra las células tumorales porque no producen LL-37, y que el tratamiento con 1,25 VD3 los transforma en citotóxicos. Otro resultado interesante de este trabajo es la demostración de que el aumento de los niveles plasmáticos de 1,25 VD3 en voluntarios deficientes por tratamiento durante 6 semanas con Vitamina D, mejora la actividad citotóxica de macrófagos M2 diferenciados a partir de monocitos, siendo esta citotoxicidad dependiente de la secreción de LL-37.

En base a los antecedentes descritos en esta Introducción, se establece como **hipótesis de trabajo** que las células LLC son capaces de modificar la funcionalidad de los neutrófilos disminuyendo su capacidad microbicida, particularmente su capacidad de generar NETs, e induciendo su diferenciación a un fenotipo protumoral.

OBJETIVOS.

Teniendo en cuenta lo descrito previamente, el objetivo general de esta tesis doctoral fue investigar el papel de los neutrófilos en LLC como así también sus posibles interacciones con las células B malignas. Para ello trabajamos sobre la base de tres objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Estudiar la formación de NETs en LLC y su interacción con las células B leucémicas.

-*Objetivos experimentales:*

- A.** Analizar de manera comparativa la capacidad de los neutrófilos de pacientes LLC y de dadores sanos para formar NETs.
- B.** Investigar si el co-cultivo de células LLC con componentes de las NETs modifica la biología de las células leucémicas *in vitro*.

Objetivo específico 2: Analizar los efectos de las células B leucémicas sobre los neutrófilos.

- *Objetivos experimentales:*

- A.** Evaluar la apoptosis de los neutrófilos en presencia de células LLC.
- B.** Estudiar la expresión de marcadores asociados con diferenciación a TANs en neutrófilos cocultivados con células B leucémicas.

Objetivo específico 3: Describir los efectos del péptido LL37 sobre las células B leucémicas.

- *Objetivos experimentales:*

- A.** Evaluar el efecto del LL37 sobre la viabilidad y activación de las células LLC.
- B.** Identificar al neutrófilo como posible fuente de LL37.

MATERIALES Y METODOS.

1. Reactivos generales.

a. Buffer Fosfato Salino (PBS).

Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na₂HPO₄ 0,078M y KHPO₄ 0,015M; pH=7,4. Las marcaciones de células con anticuerpos para evaluación por citometría de flujo se realizaron con PBS con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) de Weiner Laboratorios (Santa Fe, Argentina). Los lavados de western blot y ELISA se llevaron a cabo con PBS 0,05% tween-20.

b. Solución de Türk para el recuento de células.

La solución se preparó con violeta de genciana (100mg), ácido acético glacial (31,25ml) y agua destilada (c.s.p. 500ml). Para el recuento de células se realizaron diluciones de esta solución y se contó en cámara de Neubauer.

c. Medio de cultivo.

Se utilizó medio RPMI 1640 de Life Technologies (Grand Island, NY, USA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) de Natocor (Córdoba, Argentina) al 10% para el medio completo y con 100 U/ml penicilina o 100 µg/ml estreptomicina, todos de GIBCO Laboratories (Grand Island, USA).

d. Soluciones de Ficoll-Triyosom y Dextran.

Para la purificación de células mononucleares de sangre periférica se utilizó una solución isotónica de Ficoll 400 de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) y Triyosom 50 (aminotriazoato sódico 50%) de Justesa Imagen Argentina S.A (Bs.As., Argentina), densidad 1,077 g/l. Para el aislamiento de neutrófilos se empleó Dextran 500 GE healthcare (Munich, Alemania).

e. Buffers para Western Blot.

- *Corrida.*

Solución preparada con 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina, 0.1% SDS.

- *Transferencia.*

Solución preparada con 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 20% V/V de metanol (pH: 8,3).

2. Obtención de células de sangre periférica de pacientes LLC y de dadores sanos

El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre periférica de pacientes LLC evaluados al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad que son atendidos en los servicios de Hematología del Sanatorio Municipal “Dr. Julio Mendez” y del Hospital General de Agudos “Dr. Teodoro Álvarez”. Las muestras de dadores sanos (DS) fueron obtenidas de la fundación Hemocentro Buenos Aires. En todos los casos tanto los pacientes como los DS fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento para participar por escrito. El proyecto de investigación fue avalado por el Comité de Bioética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

a. Separación de células mononucleares y criopreservación de las muestras.

Las células mononucleares totales (CMT) fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica recogidas sobre heparina. La sangre entera se diluyó a la mitad en solución fisiológica y fue sembrada sobre una solución de Ficoll-Triyosom, este sistema bifásico fue centrifugado a 1500 rpm durante 30 minutos a 22°C. Luego se recogió la interfase conteniendo a las CMT y se las lavó dos veces con solución fisiológica centrifugando por 10 minutos, una vez a 1500 rpm y otra a 1000 rpm. Las CMT fueron finalmente resuspendidas en medio RPMI 10% SFB.

Las muestras de CMT fueron utilizadas en el mismo día o resuspendidas en SFB adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y criopresevadas en tanque de nitrógeno

líquido. La viabilidad de las muestras utilizadas luego de la criopreservación se evaluó mediante microscopía utilizando el colorante vital azul trypan. Sólo se utilizaron las muestras que tuvieran un porcentaje de células viables mayor al 90%.

b. Aislamiento de neutrófilos.

Para la obtención de los neutrófilos se tomó la capa inferior de la sangre centrifugada sobre Ficoll-Triposom que contiene los glóbulos rojos y los leucocitos polimorfonucleares. Estas células se diluyeron al medio con solución fisiológica y se añadió un tercio del volumen de Dextran 500 diluido al 6% en solución fisiológica. Se mezcló suavemente por inversión y se dejó sedimentar a los glóbulos rojos durante 20- 25 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el periodo de sedimentación se recuperó la parte superior y se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante y se procedió a lisar a los glóbulos rojos agregando agua destilada durante 40 segundos y restaurando la isotonicidad con fisiológica 10 veces concentrada. Los leucocitos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en RPMI 10% SFB. Previo a su utilización, todas las preparaciones de neutrófilos fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina (PE) de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) y analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que la contaminación con monocitos fuera menor al 0,5% y que los parámetros de dispersión *forward* y *side* (FSC y SSC respectivamente) fueran compatibles con los de células no activadas.

3. Inducción y cuantificación de NETs.

Para inducir la formación de NETs, los neutrófilos (2×10^6 células/ml) fueron sembrados en placas de 48 pocillos en medio RPMI suplementado con 10% SFB (previamente calentado a 65°C para inactivar nucleasas endógenas) y estimulados con PMA 25 ng/ml (Sigma-Aldrich) durante 4 hs a 37 °C. Alternativamente, los neutrófilos fueron estimulados con ionomicina (1 μ M), LPS (100 ng/ml) ambos de Sigma-Aldrich, TNF α (10 ng/ml) o IL-8

(0,15 o 10 ng/ml) ambos de Biolegend (San Diego, CA) como se indica en las leyendas de las figuras correspondientes. Los sobrenadantes con las NETs fueron tratados durante 30 minutos a 37°C con una dosis de 1 U/ml de nucleasa micrococcal (Mnasa) de Worthington Biochemical (Lakewood,NJ) para desprender las NETs de los detritos celulares. La reacción enzimática se detuvo con el agregado de EDTA (5 mM).

Las NETs fueron cuantificadas mediante la determinación de la concentración de ADN y la actividad de la enzima elastasa en los sobrenadantes. El ADN se cuantificó mediante detección fluorométrica (BioTeK Instruments, Winooski, VT, USA) a través de la marcación con SYBRGold (Life Technologies, Carlsbad, CA) empleando una dilución 1:2000. La actividad elastasa fue evaluada por espectrofotometría empleando el sustrato específico *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) como se describió previamente(142).

4. Microscopía confocal.

a. Análisis del proceso NETótico por microscopia confocal.

La visualización de las NETs por microscopía confocal fue llevada a cabo mediante una adaptación del protocolo descrito por Brinkmann y colaboradores(73). Brevemente, los neutrófilos (2×10^6 células/ml) fueron sembrados en portaobjetos previamente tratados con poly-L-lisina y estimulados con PMA (25ng/ml) durante 2 o 4 horas a 37°C. Luego de la incubación las muestras fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS, permeabilizadas con 0.5% Triton X-100 en PBS durante 1 minuto y bloqueadas por una hora con 5% de SFB inactivado por calor. Para la detección de elastasa, las muestras se marcaron con un anticuerpo de conejo anti-elastasa (Calbiochem, Massachusetts, MA) a una concentración de 1ug/ml por incubación durante 1 hora. Luego de lavarse, se expusieron a un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a Dylight-488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) por una hora. Para la marcación del

ADN, las muestras fueron incubadas con yoduro de propidio (IP) por 5 minutos y montadas utilizando Aqua-Poly/mount (Polysciences, Warrington, PA) como líquido de montaje. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) equipado con un objetivo Plapon 60x/1.42 y empleando como software de análisis el programa Olympus FV10-ASW. La Poly-L-Lisina, el PFA, el Triton-X100 y el IP se adquirieron en Sigma-Aldrich (St Luis, MO).

b. Análisis de colocación entre CXCR4 y LL37.

Células LLC (2×10^6 células/ml) fueron incubadas con LL37 (InvivoGen, San Diego, CA) en concentraciones de 5 o 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos. Luego las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron con PFA 4% en PBS durante 1 hora. Culminada la fijación las células fueron bloqueadas con 5% BSA durante 45 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-LL37 (Biolegend) durante 2 hs. Luego de lavarse el anticuerpo primario 2 veces, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con DyLight-488 durante 2 horas. Completado el protocolo de marcación la células fueron incubadas durante 18 horas sobre portaobjetos previamente tratados con poly-L-lisina. Finalmente los preparados fueron montados empleando Aqua-Poly/mount. Las imágenes se adquirieron usando el microscopio confocal descrito en el punto anterior.

5. Análisis de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs).

Para la determinación de la producción intracelular de IROs, se empleó el colorante fluorescente Dihidrorodamina (DHR) de Life Technologies (Carlsbad, CA). Los neutrófilos de DS o de pacientes LLC (2×10^6 células/ml) fueron incubados con 2 μM de DHR por 30 min a 37 °C para su marcación, luego se lavaron una vez y fueron expuestos a PMA (25 ng/ ml) o PBS. Luego de 20 min de incubación las células fueron colocadas en hielo y adquiridas por el citómetro de flujo inmediatamente.

6. Evaluación de la actividad de elastasa y mieloperoxidasa (MPO) en neutrófilos.

Los neutrófilos provenientes de pacientes LLC o DS (5×10^5) fueron lisados con PBS conteniendo 1% Triton X-100, centrifugados, y los sobrenadantes fueron colectados para la inmediata determinación de las actividades enzimáticas. La actividad de elastasa se evaluó tal como se describió previamente en la cuantificación de las NETs. La actividad de MPO fue cuantificada utilizando el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) de Thermo Fisher (Massachusetts, MA). Brevemente, 25 μ l de cada muestra se combinaron con 25 μ l de TMB y se incubaron a 37 °C por 5 min. La reacción se detuvo con el agregado de 50 μ l de H₂SO₄ y se midió la absorbancia a 450 nm.

7. Determinación de la concentración de IL-8, IL-10 y TGF- β por ELISA y ensayos de depleción de citoquinas.

La detección de citoquinas y quimiocinas se realizó por ELISA utilizando *kits* comerciales y siguiendo las instrucciones del proveedor. Los *kits* empleados fueron: para IL-8 el comercializado por BD-Biosciences (Franklin Lakes, NJ), para IL-10 el comercializado por Biolegend (San Diego, CA) y para TGF- β el de Thermo Fisher (Massachusetts, MA).

Los ensayos de depleción de cada uno de estos factores se desarrollaron de la siguiente manera. Se agregó el anticuerpo de captura correspondiente a cada citoquina y diluido en PBS en placas de 48 pocillos incubándose por 18 horas a temperatura ambiente para permitir su adhesión al plástico. Luego de lavar 3 veces con PBS, se agregó 300 μ l del plasma o medio condicionado a depletar y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, el plasma o medio condicionado se recolectó para la realización de los ensayos pertinentes.

Como particularidad, los medios condicionados que fueron empleados para la detección/depleción de TGF- β fueron sometidos a un paso de acidificación, mediante el agregado de HCL 1M durante 10 min y neutralización mediante el agregado de NaOH 1M.

Este tratamiento cambia la conformación del TGF- β permitiendo que sea reconocido por los anticuerpos.

8. Detección y cuantificación de proteínas por western blot.

Se partió de 5×10^6 células para cada condición experimental. Los extractos proteicos se realizaron agregando *loading buffer* (Tris HCL pH 6,8 1M, SDS, glicerol 30% y Azul de bromofenol 0,04%) – 5% de β -mercaptoetanol sobre el pellet de células. Se calentaron las muestras en el *loading buffer* durante 5 min a 97°C, y una vez cumplido dicho tiempo las muestras fueron colocadas inmediatamente en hielo. Estos extractos fueron sembrados en el momento o fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida 12% y se corrieron con amperaje constante de 35 mA. Una vez concluida la corrida electroforética, se realizó la transferencia húmeda a membranas de PVDF empleando un amperaje de 300 mA durante 90 minutos. Las membranas fueron luego bloqueadas con BSA 2,5% en tampón de lavado durante 2 horas luego de las cuales fueron incubadas durante 18 horas con los anticuerpos primarios correspondientes según el protocolo experimental. En este trabajo se emplearon anticuerpos anti-BCL2 (IgG de conejo), anti-caspasa-3 (IgG de ratón) ambos de Biolegend y anti-BFL1 (IgG de ratón) de Cell Signaling (Massachusetts, USA). Completado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario se procedió al lavado (3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS + Tween 0.05%) y a la incubación durante 90 minutos con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa correspondiente: anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). En todos los casos se realizó también en la misma membrana el revelado de β -actina utilizando para ello un anticuerpo específico de Cell Signaling. Este “control de carga” permite la relativización del contenido proteico de las proteínas de interés.

El revelado del western blot se llevó a cabo utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (de sus siglas en inglés, *Enhanced Chemiluminescence*) el cual al reaccionar con la peroxidasa en presencia de H₂O₂ genera un producto luminoso detectable con placas fotográficas. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software ImageJ.

9. Dot blot para la detección de LL37 en sobrenadantes de cultivo.

Con la finalidad de determinar la presencia del péptido LL37 en sobrenadantes de cultivo se adaptó el protocolo de western blot y en lugar de sembrar extractos proteicos en los geles de poliacrilamida se sembraron los sobrenadantes directamente sobre las membranas de PVDF. Se las dejó secar y luego se procedió con la misma secuencia de pasos descripta previamente desde el bloqueo al revelado. En este caso se usó como anticuerpo primario anti-LL37 policlonal (IgG de conejo) y el mismo anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa empleado previamente.

10. Ensayos de migración de las células LLC en respuestas a CXCL12 en presencia o ausencia de LL37.

Para los ensayos de quimiotaxis se utilizaron Transwells de Corning Incorporated (NY, USA) de 96 pocillos, con membranas de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y poros de 5 µm. En el compartimiento inferior se agregaron 200 µl de medio RPMI (1% SFB) conteniendo a la quimiocina CXCL12 (25ng/ml) de PeproTech (DF, Mexico) sola o junto a LL37 (5µM) de Invivogen (San Diego, CA), y en el compartimiento superior se sembró la suspensión celular correspondiente (1 x 10⁶ células en 70 µl del mismo medio). Como control de migración espontánea se realizó el mismo ensayo pero sin agregar CXCL12 en el compartimiento inferior. Cada condición experimental se llevó a cabo por duplicado.

Las células se incubaron a 37°C durante 2 horas. Pasado este tiempo se recolectaron las células que migraron hacia el compartimiento inferior y se marcaron con anticuerpo anti-CD19 para identificar a las células B leucémicas. El recuento de estas células se realizó

por citometría de flujo, determinando el número de células que son adquiridas en un minuto(143). El índice de migración se calculó como el número de células CD19⁺ que migraron al pocillo con quimiocina con respecto al número de células que migraron espontáneamente (control sin quimiocina)(144).

11. Inmunomarcación y citometría de flujo.

a. Anticuerpos y sondas.

A lo largo de este trabajo de tesis se emplearon los anticuerpos conjugados dirigidos contra los siguientes antígenos de membrana: CD86-PE, CD62L-PerCP y CD49d-PE de Biolegend (San Diego, CA), CD69-PE, CD80-FITC, CD16-PerCP, CD38-PE y CXCR4-PE de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), CD19-PerCP de Beckman-Coulter (Brea, CA), HLA-DR-FITC de ImmunoTools (Friesoythe, Alemania). También se utilizó la sonda fluorescente AnexinaV-FITC de ImmunoTools (Friesoythe, Alemania).

En todas las marcaciones de antígenos de superficie realizadas a lo largo de esta tesis las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes diluidos en tampón de marcación (PBS suplementado con 0,5% BSA). La incubación fue de 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Al cabo de la incubación las células se lavaron una vez con el tampón de marcación y se resuspendieron en Isoflow para ser analizadas en el citómetro de flujo (FACScan BD Scalibur). Se explicarán con más detalle aquellas inmunomarcaciones cuyo protocolo cuente con alguna particularidad.

b. Modulación de la expresión de marcadores de activación y de la apoptosis en células LLC incubadas con NETs.

Alícuotas de CMTs (>93% células LLC) de pacientes LLC fueron resuspendidas en medio completo y sembradas en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml. Las NETs fueron obtenidas por estimulación de los neutrófilos con ionimicina (1 µg/ml) durante 1 hora, luego las células fueron lavadas dos veces con medio completo y vueltas

a incubar durante 3hs a 37 °C. Los sobrenadantes con las NETs fueron recuperados de la misma manera que se describió previamente, salvo que en lugar de utilizar Mnsa para separar las NETs de los detritos celulares se realizó una disrupción mecánica. Las NETs se agregaron a las CMTs en una dilución final de 1:3. Las CMTs fueron cultivadas o no con NETs y se evaluó la expresión de los siguientes marcadores de activación a diferentes tiempos: CD69 a las 24hs, CD86 a las 48hs y CD80 a las 72hs en células CD19 positivas. Se eligieron estos tiempos para cada marcador teniendo en cuenta las mediciones óptimas para cada uno de ellos.

A las 48 horas también se evaluó la apoptosis de las células leucémicas mediante la marcación con AnexinaV/IP. Para ello, las células leucémicas se incubaron con Anexina V FITC diluida en *Binding Buffer* (10Mm Hepes/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5mM CaCl₂) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El IP fue agregado segundos antes de adquirir la muestra en el citómetro a una concentración de 1µg/ml.

c. Niveles de apoptosis en neutrófilos cocultivados con células leucémicas.

Los neutrófilos (1×10^6 /ml) de DS fueron incubados con células LLC (>98% de células LLC, <0,5 CD14⁺ contaminantes) en una relación 1:2 durante 24-72 horas a 37°C en medio completo. De manera adicional se realizaron los cocultivos durante 24 horas en cámaras transwell sembrando en la canasta superior a las células LLC y en el pocillo inferior a los neutrófilos. La apoptosis de los neutrófilos se evaluó a los diferentes tiempos mediante la marcación con AnexinaV-FITC y análisis por citometría de flujo.

d. Internalización de ADN-CpG en células leucémicas en presencia de LL37.

Para evaluar la internalización de complejos ADN-CpG a células B LLC, alícuotas de las mismas (2×10^6 /ml) fueron estimuladas con ADN-CpG-FITC (IDT Argentina) en presencia o ausencia de LL37 durante 30 minutos a 37°C. Luego las células se lavaron una vez con PBS y se analizaron por citometría de flujo. Para diferenciar el ADN-CpG-FITC

internalizado del pegado en membrana plasmática, las células se expusieron a los complejos en frío, se incubaron por 30 minutos y se lavaron antes de ser analizadas en el citómetro de flujo. La diferencia en la media de intensidad de fluorescencia entre las células expuestas a 37°C o en frío a ADN-CpG-FITC fue tomada como medida de internalización del mismo.

e. Internalización de CXCR4 en células leucémicas inducida por LL37.

Las células LLC (2×10^6 /ml) fueron incubadas con LL37 (5 μ M) durante 25 minutos a 37°C. Se tomaron muestras a los 0, 5, 10 y 25 minutos siendo colocadas de manera inmediata en hielo. Una vez colectadas todas las muestras se marcaron las células con un anticuerpo monoclonal anti-CXCR4-PE y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. La expresión de CXCR4 a tiempo 0 corresponde a la máxima expresión en membrana del receptor.

f. Evaluación del contenido intracelular de LL37 en neutrófilos.

Alícuotas de 1×10^6 de neutrófilos purificados de DS por cada condición experimental fueron fijados con PFA 1% durante 30 minutos y luego permeabilizados con saponina 0,1% durante 30 minutos adicionales. Una vez permeabilizadas las células se incubaron en SFB durante 1 hora para bloquear el pegado inespecífico de los anticuerpos a utilizar. Luego los neutrófilos se incubaron con un anticuerpo anti-LL37 (IgG de ratón) de Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA) durante 90 minutos. Concluida la incubación las células se lavaron y se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente, en este caso anti-IgG de ratón conjugado con DyLight-488 de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

12. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0. La significancia estadística se determinó utilizando los test no paramétricos: Test de Wilcoxon o Test de Mann-Whitney para comparar entre muestras pareadas o no pareadas respectivamente. El análisis estadístico entre más de dos grupos se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis o el Test de Friedman para comparar entre muestras no pareadas o pareadas respectivamente. En ambos casos se empleó el Test de Dunn's como posttest. Las correlaciones se analizaron mediante la determinación del coeficiente de Spearman. Los análisis de asociación se realizaron mediante el empleo de la Prueba de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS - PARTE I – Formación de NETs en LLC.

Puesta a punto de la formación de NETs.

De manera previa a analizar en forma comparativa la capacidad de los neutrófilos de pacientes LLC y dadores sanos para liberar NETs, se realizó la puesta a punto de las condiciones experimentales para la correcta visualización y cuantificación de dichas estructuras. A tal fin se estimularon con PMA (25ng/ml) durante 4 hs a 37°C, neutrófilos de dadores sanos (2×10^6 células/ml) adheridos a portaobjetos previamente tratados con poly-L-lisina. Luego del periodo de incubación las muestras fueron marcadas con anticuerpo anti-elastasa y con ioduro de propidio (IP) para visualizar la formación de NETs (Fig. 6A). En paralelo se realizó la estimulación de neutrófilos con PMA en tubos eppendorf para la evaluación cuantitativa de la formación de NETs. Una vez finalizada la incubación se obtuvieron los sobrenadantes y se evaluó la actividad de elastasa y la concentración de ADN en los mismos. Para confirmar que los niveles de elastasa y ADN detectados corresponden a la formación de NETs y no a la presencia de neutrófilos necróticos, se inhibió la actividad de la NADPH oxidasa, enzima imprescindible para gatillar la NETosis por PMA, incubando a los neutrófilos con 10 μ M de DPI (Fig. 6B).

Capacidad formadora de NETs de neutrófilos aislados de pacientes LLC.

Para la realización de los siguientes ensayos se seleccionaron muestras provenientes de 23 pacientes LLC con diferentes estadios de progresión de la patología y pertenecientes a distintos grupos de riesgo. Sus características clínicas se ilustran en la tabla 2.

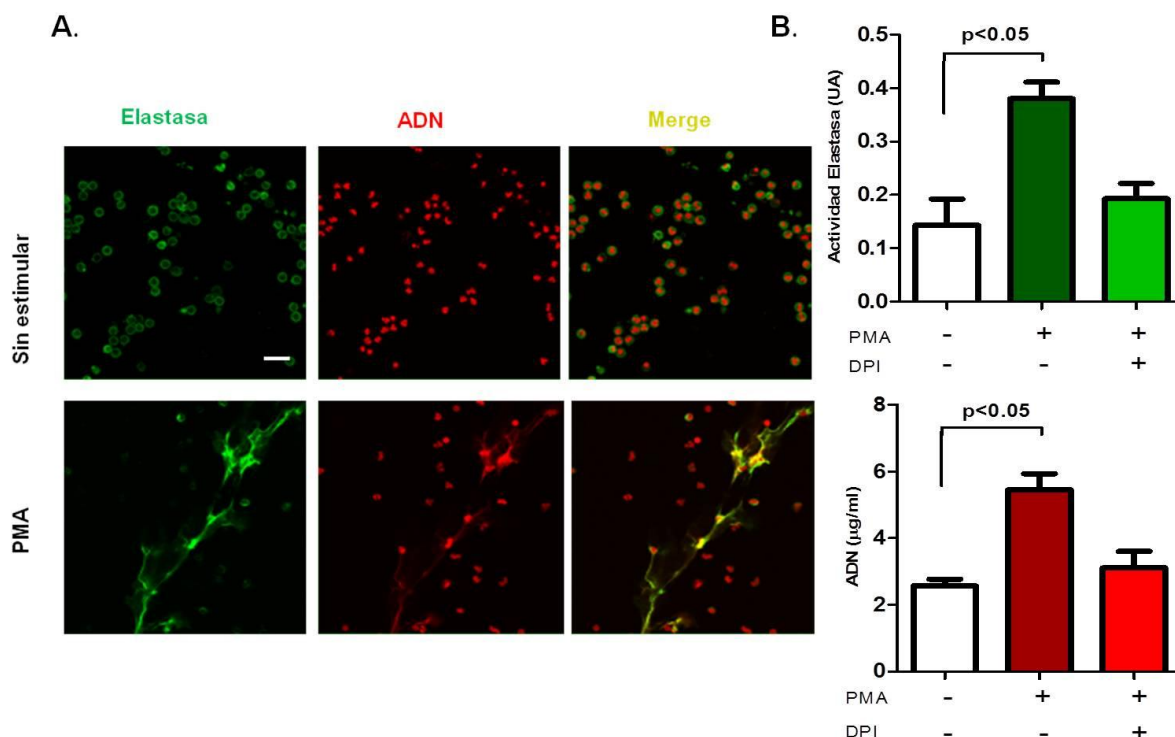


Figura 6. Puesta a punto de la visualización y cuantificación de NETs. **A-** Neutrófilos (2×10^6 cells/ml) de dadores sanos fueron incubados con PMA (25ng/ml) o medio solo (sin estímulo) durante 4 hs. Los preparados se marcaron con anticuerpos anti-elastasa (verde) y con ioduro de propidio (rojo), y se analizaron por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas ($n = 5$). La barra indica 25 µm. **B-** Actividad de elastasa y concentración de ADN determinadas en sobrenadantes de neutrófilos estimulados o no con PMA. Se agregó DPI (10 µM) 30 min antes de la estimulación con PMA para inhibir la activación de la NADPH oxidasa. Los resultados muestran la media \pm SEM de 5 experimentos. La significancia estadística fue determinada mediante el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's ($p < 0.05$).

Una vez establecidas las condiciones experimentales y seleccionadas las muestras a emplear se procedió con la evaluación de la formación de NETs de manera comparativa entre neutrófilos de dadores sanos y de pacientes LLC, estimulando las células (2×10^6 células/ml) de ambos grupos de la misma manera que se describió anteriormente (Fig. 7). Las muestras de los dadores sanos (DS) fueron obtenidas de individuos de edad y sexo comparables a los pacientes LLC.

	Pacientes LLC (n=23)
Edad media (rango)	70 (50-87)
Genero (Masculino/Femenino)	17/6
Linfocitos , x10 ³ /μL (rango)	27,9 (4,7-67,5)
Leucocitos, x10 ³ /μL (rango)	31,6 (7,7-98,7)
Plaquetas, 10 ³ /μL (rango)	179,2 (68-397)
Estadio de la enfermedad	
Binet A	15
Binet B	5
Binet C	3
CD38 > 30%	12 (52%)
CD49d > 30%	5 (22%)

Tabla 2. Datos clínicos de la cohorte de pacientes LLC incluidos en el estudio.

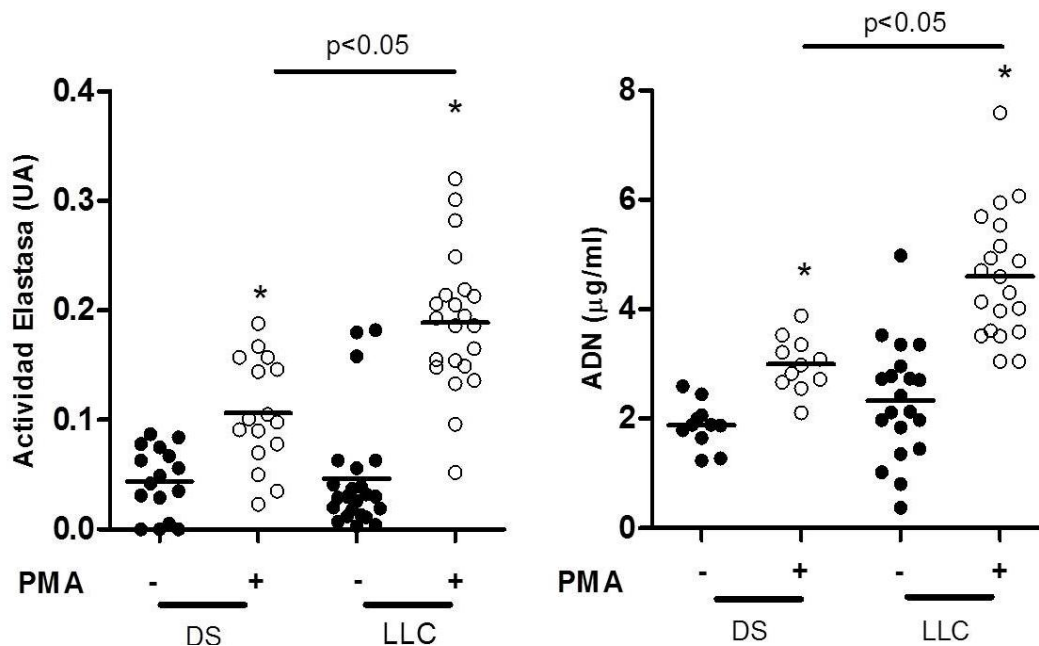


Figura 7. Evaluación comparativa de formación de NETs en respuesta a la estimulación con PMA. La actividad de elastasa y la concentración de ADN fueron determinadas en los sobrenadantes de neutrófilos (DS o LLC) sin estimular (puntos negros) o estimulados con PMA (puntos blancos). Se muestran los valores individuales para cada muestra y la media correspondiente a cada grupo. La significancia estadística ($p < 0.05$) fue obtenida mediante el test de Kruskal–Wallis seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. * indica $p < 0.05$ entre neutrófilos sin estimular y estimulados con PMA.

Los resultados obtenidos mostraron que los neutrófilos de pacientes LLC producen mayores niveles de NETs que los neutrófilos de DS al ser estimulados con PMA. Estos resultados, en cierto modo, refutan nuestra hipótesis de trabajo ya que esperábamos que los neutrófilos de los pacientes LLC presentaran fallas en su capacidad productora de NETs, que explicaran la mayor propensión a las infecciones por bacterias capsuladas. Por lo tanto y dado que el PMA es el inductor más potente de la NETosis que se conoce, se evaluaron otros estímulos de menor intensidad para determinar si se reproduce lo observado para PMA. A tal fin se estimularon los neutrófilos con Ionomicina (1 μ M) o con TNF- α (10 ng/ml) + LPS (100 ng/ml) evaluándose los niveles de elastasa y ADN en los sobrenadantes correspondientes (Fig. 8).

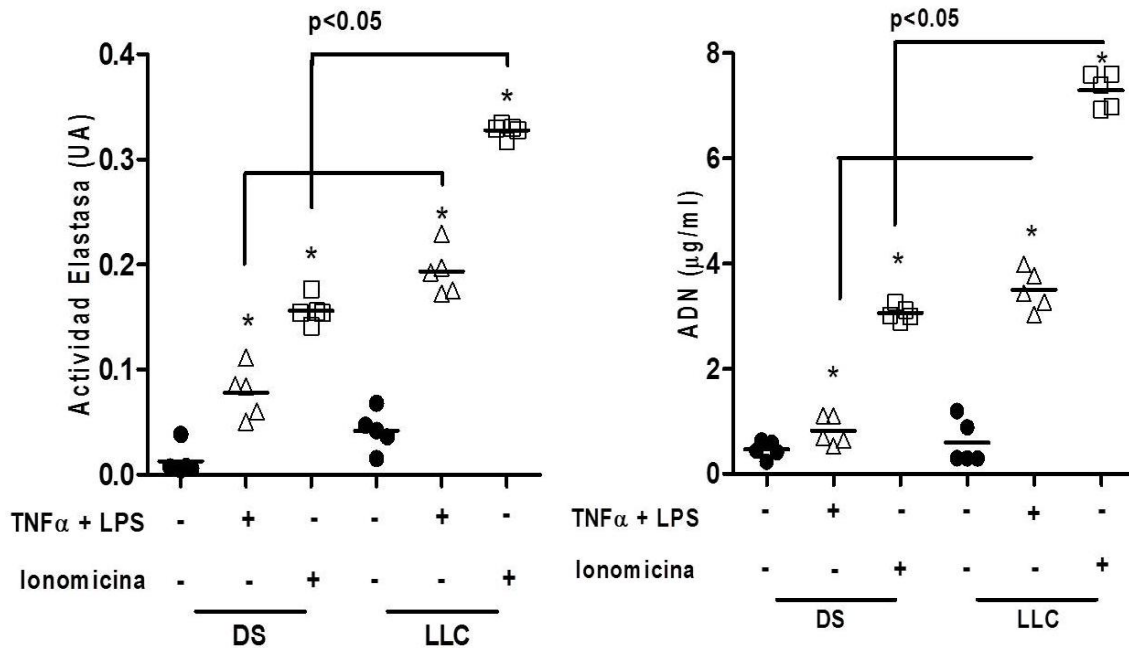


Figura 8. Formación de NETs en respuesta a ionomicina y TNF- α /LPS. La actividad elastasa y la concentración de ADN fueron determinadas en los sobrenadantes de neutrófilos (DS o LLC) sin estimular (puntos negros) o estimulados con ionomicina (triángulos blancos) o con TNF- α + LPS (cuadrados blancos). Se muestran los valores individuales para cada muestra y la media correspondiente a cada grupo. La significancia estadística fue obtenida mediante el test de Kruskal–Wallis seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. * indica $p < 0.05$ neutrófilos sin estímulo versus estimulados dentro de cada grupo.

Al igual que lo ocurrido para el caso de los neutrófilos estimulados con PMA, cuando la estimulación se llevó a cabo con inductores alternativos de NETosis, los sobrenadantes pertenecientes a los neutrófilos de pacientes estimulados exhibieron niveles mayores de actividad elastasa y de concentración de ADN respecto a los dadores sanos. Para confirmar estas observaciones se evaluó por microscopía confocal la translocación de la elastasa al núcleo, lo cual constituye un evento clave y temprano de la NETosis. A tal fin, se sembraron neutrófilos de DS y de pacientes LLC sobre cubreobjetos previamente tratados con poly-L-lisina y se estimularon con PMA (25ng/ml) durante 2 hs a 37°C. En este caso la estimulación se realiza por 2 hs para permitir la observación de los cambios morfológicos de los neutrófilos antes de que se complete la liberación de las NETs. Concluida la incubación, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-elastasa y con IP (Fig. 9A). Se analizaron diferentes campos y se cuantificaron como neutrófilos NETóticos los que exhibieron colocalización de ambas señales fluorescentes (Fig. 9B).

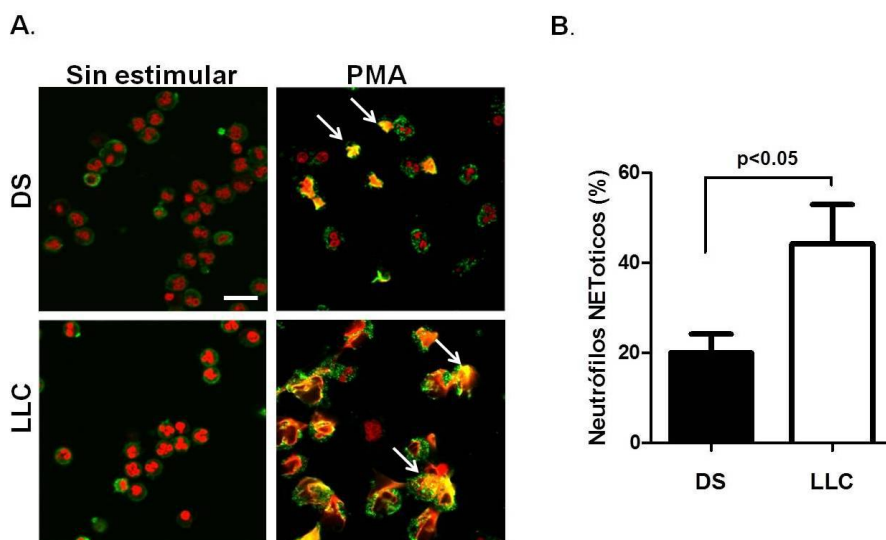


Figura 9. Identificación y recuento de neutrófilos NETóticos. (A) Imágenes representativas de neutrófilos de DS y de pacientes LLC estimulados durante 2hs con PMA. Se identificaron como neutrófilos NETóticos los que exhiben colocalización de elastasa (verde) y ADN (rojo) (punta de flecha). La barra de escala indica 25 μ m. (B) Porcentajes de neutrófilos NETóticos obtenidos de la cuantificación de varios campos de preparados de DS y LLC (media \pm SEM de 5 experimentos de cada grupo). La significancia estadística se obtuvo realizando el test de Mann–Whitney ($p < 0.05$).

Al analizar la translocación de la elastasa al núcleo mediante microscopía confocal se observó que a las 2 hs de estimulación con PMA el porcentaje de neutrófilos NETóticos fue mayor en los preparados correspondientes a los pacientes LLC. No solo resultó mayor el número de células con estas características, sino también, se observó que éstas exhibían un mayor grado de avance del proceso NETótico, como lo muestra el mayor tamaño de las mismas.

Análisis de factores intrínsecos que pudieran explicar la mayor capacidad formadora de NETs de los neutrófilos LLC.

Teniendo en cuenta el papel relevante que tiene la producción de IROs para la generación de NETs en respuesta a la mayoría de los estímulos estudiados, se evaluó si la incrementada capacidad de formar NETs de los neutrófilos provenientes de pacientes LLC está relacionada con una mayor producción de estas moléculas. Para lograr este objetivo los neutrófilos de DS y de pacientes LLC fueron incubados con el colorante DHR y luego estimulados con PMA durante 20 minutos. Cumplido el periodo de incubación las células fueron colocadas en hielo y analizadas por citometría de flujo de manera inmediata. Teniendo en cuenta que la DHR es un colorante que aumenta su intensidad de fluorescencia cuando se oxida, con la finalidad de evaluar el contenido de IROs se estableció la diferencia entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los neutrófilos sin estimular y la IFM de los neutrófilos estimulados con PMA (Fig. 10A). Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en los niveles de producción de IROS entre los neutrófilos de DS y de pacientes LLC (Fig. 10B), por lo que la mayor capacidad de estos últimos para formar NETs debe ser atribuida a otros factores.

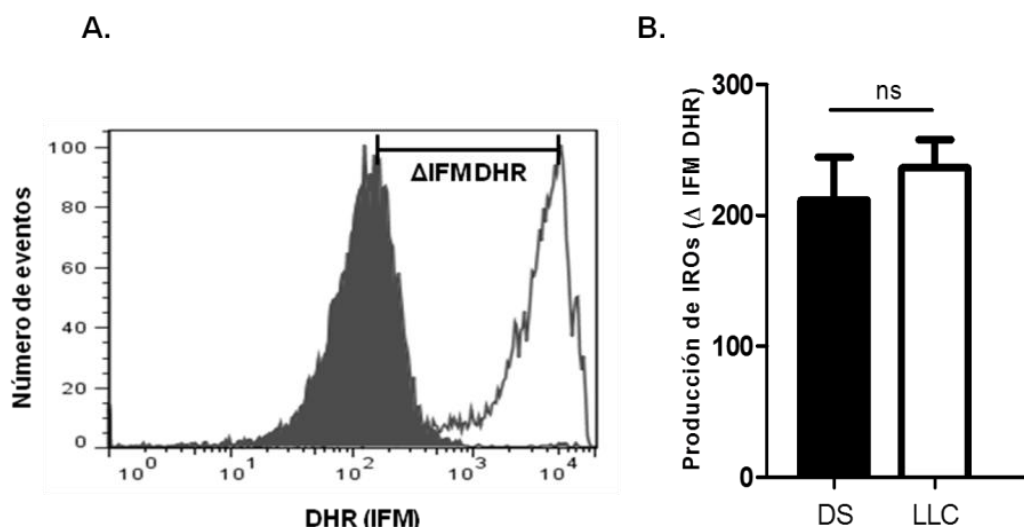


Figura 10. Niveles de producción de intermediarios reactivos del oxígeno en DS y pacientes LLC. (A) Histograma representativo de neutrófilos de paciente LLC marcados con DHR, sin estimular (negro) y estimulados con PMA (blanco). Se indica el Δ IFM DHR calculada entre ambas condiciones. (B) Cuantificación de los Δ IFM calculados para ambos grupos. Se ilustra la media \pm SEM de 5 experimentos de cada grupo. La significancia estadística se evaluó realizando el test de Mann–Whitney. ns: diferencias no significativas.

Como se señalara en la Introducción, la translocación de la elastasa desde los gránulos al núcleo y la subsiguiente liberación de la MPO constituyen eventos esenciales para que tenga lugar la descondensación de la cromatina necesaria para la formación de NETs. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la actividad de elastasa (Fig.11A) y de MPO (Fig. 11B) en lisados celulares partiendo del mismo número de neutrófilos de pacientes LLC y de dadores sanos para determinar si la mayor capacidad de los primeros para producir NETs se debía a diferencias en la actividad de estas enzimas. No se encontraron diferencias significativas entre los neutrófilos de ambos grupos que puedan explicar una mayor actividad NETótica.

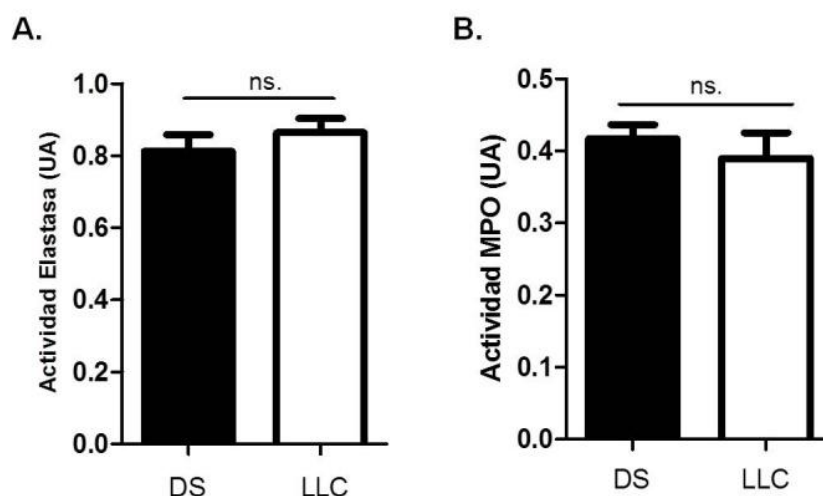


Figura 11- Contenidos de elastasa y MPO en lisados de neutrófilos. Neutrófilos (5×10^5) de DS y de pacientes LLC fueron lisados con PBS 1% Triton X-100, centrifugados, y los sobrenadantes colectados para la inmediata determinación de la actividad enzimática de elastasa **(A)** y de MPO **(B)**. Se ilustran las medias \pm SEM ($n=6-10$), ns: no significativo según test de Mann–Whitney.

Evaluación de factores plasmáticos como agentes potenciadores de la respuesta NETótica.

La NETosis puede ser gatillada por un amplio espectro de agentes, entre los que se destacan algunas citoquinas proinflamatorias. Entre estas citoquinas resaltan la IL-8 y el TNF- α por su capacidad de preconditionar a los neutrófilos tornándolos más susceptibles a la liberación de NETs (145, 146). Este fenómeno cobra relevancia en ciertas condiciones patológicas, como por ejemplo, en aquellos pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, en los cuales las altas concentraciones plasmáticas de estas citoquinas inducen el estallido respiratorio en los neutrófilos y estimulan la generación de NETs(147).

Existe evidencia que los niveles plasmáticos de IL-8 y TNF- α , entre otras citoquinas, se encuentran incrementados en los pacientes con LLC (148), por lo cual decidimos evaluar si los plasmas de nuestra cohorte de pacientes eran capaces de sensibilizar a los neutrófilos de DS para liberar NETs en respuesta al PMA. Para cumplir dicho objetivo se

preincubaron neutrófilos de DS con plasma LLC (dilución 1:2) durante 40 minutos, luego las células fueron lavadas, estimuladas con PMA (25 ng/ml) y cultivadas durante 3,5 hs para permitir la liberación de las NETs. Además, como control se realizaron preincubaciones con plasmas obtenidos de DS (Fig. 12). Cabe destacar que no se observaron diferencias entre muestras obtenidas con diferentes anticoagulantes (ya sea heparina o EDTA).

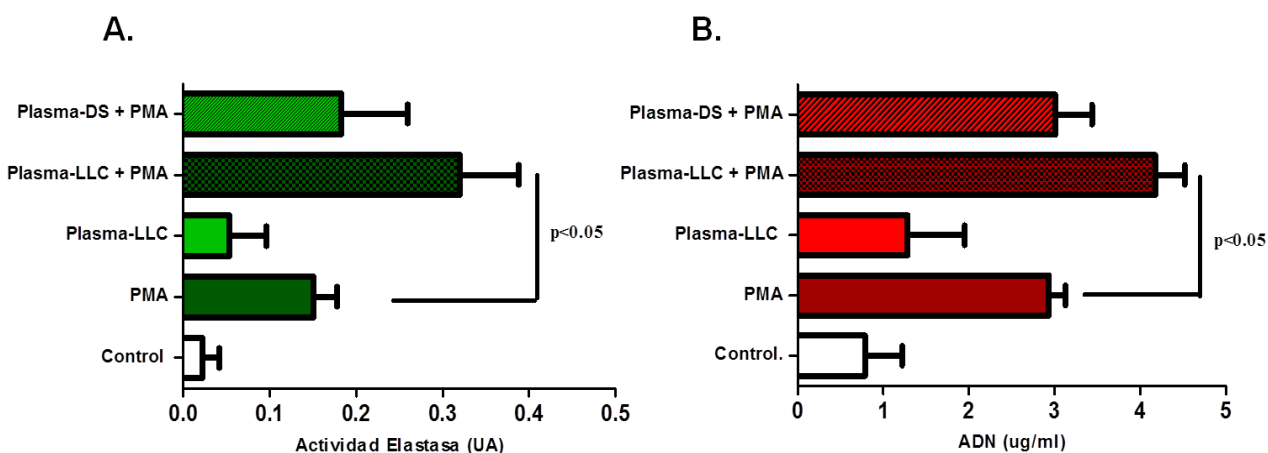


Figura 12. Efecto de la preincubación con plasma LLC sobre la formación de NETs. Neutrófilos de DS fueron preincubados con plasma LLC o con plasma DS (1:2) durante 40 min luego de los cuales las células se lavaron y resuspendieron en medio completo donde se las estimuló con PMA (25 ng/ml) para inducir la formación de NETs. Se muestran la actividad elastasa (A) y la concentración de ADN (B) en las distintas condiciones. Las barras indican la media \pm SEM ($n = 10$). La significancia estadística fue determinada usando el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Se observó que la preincubación con el plasma LLC incrementa la liberación de NETs en respuesta a PMA, no así el plasma de dadores sanos (Fig. 13A). Asimismo se encontró que el plasma LLC no induce la NETosis en ausencia de PMA, aunque se observaron niveles algo mayores de actividad elastasa y ADN en los sobrenadantes de neutrófilos preincubados con plasma LLC en relación al control. Con la finalidad de corroborar estos resultados se realizó el recuento de neutrófilos NETóticos a las 2hs de estimulación con

PMA en presencia o ausencia de plasma LLC, como así también cultivados en presencia de plasma LLC solo (Fig. 13B).

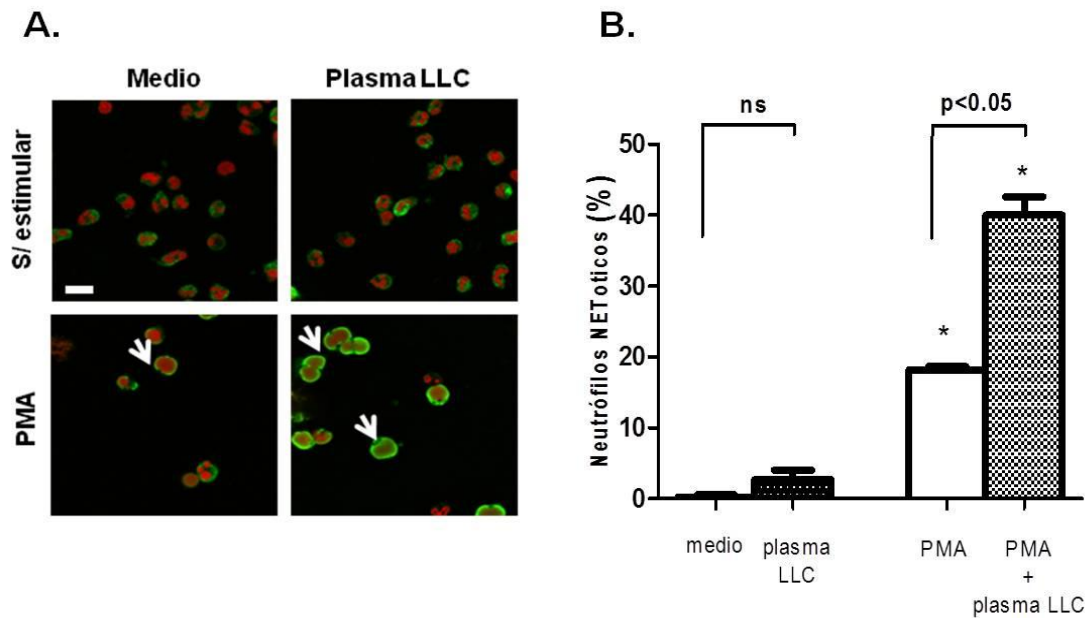


Figura 13. Recuento de neutrófilos NETóticos estimulados en presencia de plasma LLC. (A) Neutrófilos de DS fueron estimulados con PMA en presencia o no de plasma LLC. Luego de 2hs de cultivo las células se marcaron con anti-elastasa (verde) e IP (rojo). Se cuantificaron como NETóticos aquellos neutrófilos que perdieron la estructura nuclear lobular y exhibieron colocalización de ambas señales fluorescentes (puntas de flecha). **(B)** Cuantificación de neutrófilos NETóticos en las 4 condiciones analizadas. Las barras indican la media \pm SEM ($n=5$). La significancia estadística fue determinada usando el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. * representa significativamente mayor que el respectivo control ($p<0.05$).

Al igual que para el caso de las determinaciones realizadas en los sobrenadantes de los neutrófilos estimulados, el recuento de los neutrófilos NETóticos fue mayor cuando las células fueron tratadas con PMA en presencia de plasma LLC. Estos resultados sugieren que un factor soluble presente en el plasma de los pacientes es responsable, al menos en parte, de la mayor capacidad de producir NETs de los neutrófilos LLC.

Papel de la IL-8 plasmática en el preconditionamiento de los neutrófilos para producir NETs.

Entre los potenciales candidatos presentes en el plasma LLC capaces de favorecer la producción de NETs, decidimos evaluar a la IL-8 dado que su participación en la generación de NETs ha sido reportada por varios grupos de investigación (145, 147) . Por otro lado y tal como se mencionara los niveles plasmáticos de IL-8 están aumentados en la mayoría de los pacientes LLC. En primer lugar, corroboramos que nuestra cohorte de pacientes presentaba niveles de IL-8 muy incrementados en relación a los dadores sanos de edad comparable (Fig. 14A). A continuación, y con la finalidad de determinar si la IL-8 plasmática es responsable, al menos en parte, de condicionar a los neutrófilos de los pacientes LLC para generar una mayor respuesta NETótica, se redujeron los niveles de la citoquina incubando los plasmas LLC durante 1h en placas recubiertas con anticuerpo anti-IL-8 (Fig.14B). Posteriormente se comparó la capacidad del plasma LLC completo con el correspondiente plasma depletado de IL-8 para sensibilizar a neutrófilos de DS a la NETosis inducida por PMA.

Los resultados indicaron que al disminuir considerablemente la concentración de IL-8 en el plasma LLC se redujo en forma significativa la capacidad del plasma para favorecer la producción de NETs (Fig. 14C), resaltando la importancia de la IL-8 en el efecto descripto.

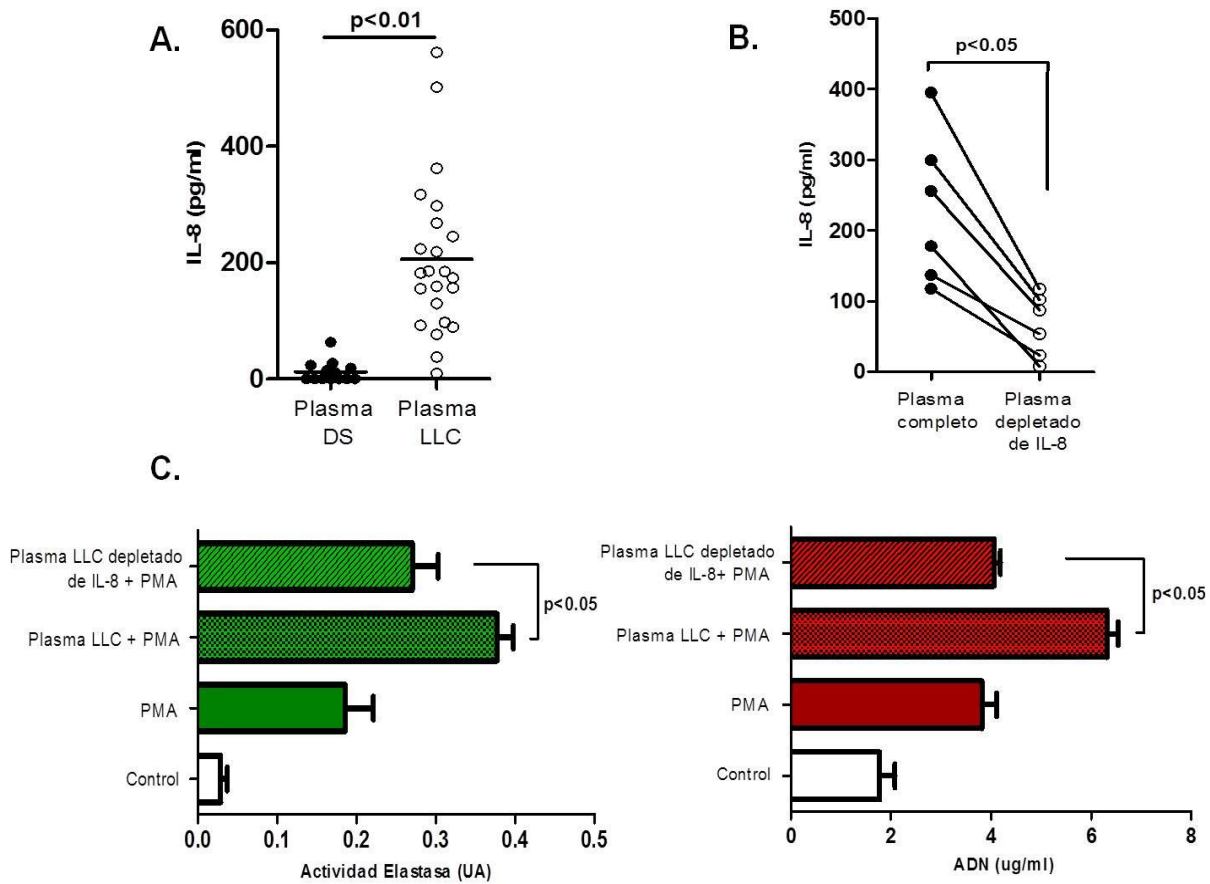


Figura 14. Papel de la IL-8 plasmática sobre la generación de NETs. (A) Niveles de IL-8 en el plasma de dadores sanos (DS) y de pacientes LLC. Se ilustran los valores individuales y la media de cada grupo. (B) Concentración de IL-8 plasmática antes y después de ser depletada por interacción con anti-IL-8 inmobilizado. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Mann-Whitney. (C) Efecto del plasma completo o depletado de IL-8 sobre la formación de NETs. Se pre-incubaron neutrófilos de DS con plasma LLC depletado o no de IL-8 y luego se estimularon con PMA (25 ng/ml). Transcurridas las 4hs se cuantificó la actividad elastasa y la concentración de ADN en los sobrenadantes. Las barras indican la media \pm SEM ($n=10$). La significancia estadística fue determinada usando el test de Friedman seguido por el postest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Estos hallazgos nos alentaron a determinar si existe correlación entre los valores plasmáticos de IL-8 de los pacientes LLC de nuestra cohorte y los niveles de NETs obtenidos *in vitro* con los neutrófilos aislados de cada uno de ellos. Como se muestra en la Figura 15, tanto la actividad elastasa como la concentración de ADN cuantificadas en

los sobrenadantes de neutrófilos NETóticos de pacientes LLC correlacionaron de manera significativa con los niveles plasmáticos de IL-8.

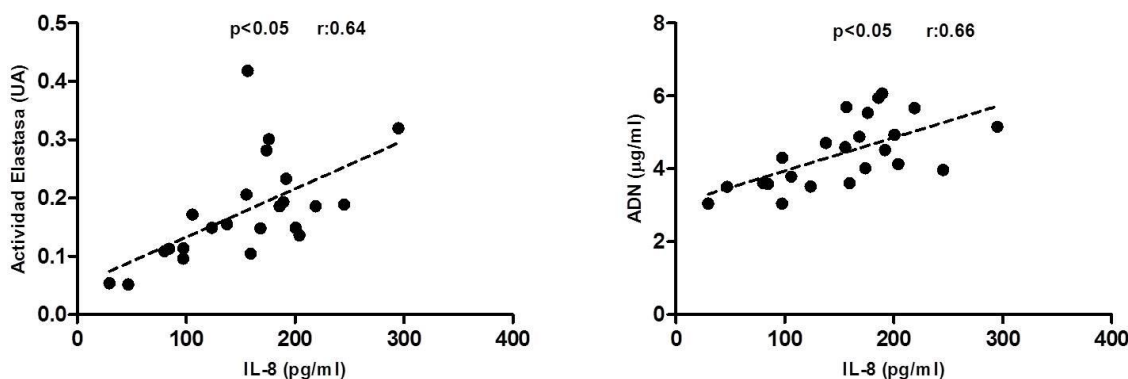


Figura 15. Correlación entre los niveles de IL-8 en plasma y de NETs producidas in vitro.

Correlación entre los niveles de IL-8 en plasma de pacientes LLC y la capacidad de formar NETs en respuesta a la estimulación con PMA. Se muestran los coeficientes de correlación de Spearman.

Teniendo en cuenta trabajos publicados que muestran que la IL-8 recombinante induce la formación de NETs [17, 28] pero, sin embargo, los plasmas de pacientes LLC no fueron capaces de gatillar la NETosis en forma directa, decidimos evaluar en nuestras condiciones experimentales el efecto de IL-8 recombinante sobre la liberación de NETs. Para ello utilizamos dos concentraciones de IL-8: 10 ng/ml que se encuentra en el rango de las usadas en los trabajos citados y 0.15 ng/ml, que fue la concentración promedio de IL-8 detectada en los plasmas de los pacientes LLC. Los resultados obtenidos mostraron que sólo la primera concentración fue capaz de inducir la formación de NETs (Fig. 16A). Con la finalidad de comprobar si la IL-8 a bajas concentraciones es capaz de incrementar la respuesta a PMA, suplementamos plasmas de DS con una concentración de 0.15 ng/ml de IL-8 (Fig. 16B) y observamos que estos adquieren la capacidad de potenciar la generación de NETs en respuesta a PMA de la misma manera que ocurre con los plasmas LLC.

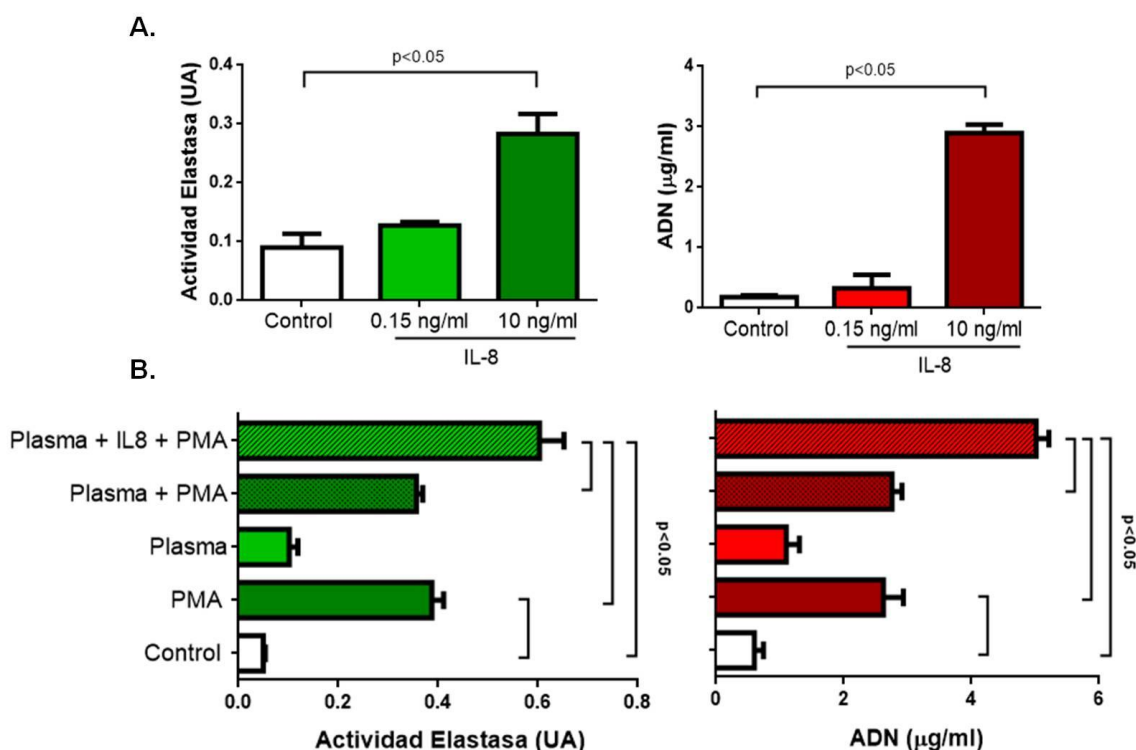


Figura 16. IL-8 como agente inductor de NETosis. (A) Neutrófilos (2×10^6 células/ml) fueron estimulados con IL-8 (10ng/ml o 0,15ng/ml) durante 4 hs. Luego se cuantificaron en los sobrenadantes la actividad de elastasa y la concentración de ADN. Se grafican la media \pm SEM de 6 experimentos (B) Neutrófilos (2×10^6 células/ml) fueron pre-incubados con plasma de DS suplementado o no con IL-8 (0.15ng/ml). Se muestran las medias \pm SEM para cada grupo (n=10). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman y el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.01$.

En conjunto todos estos resultados sugieren que los niveles plasmáticos incrementados de IL-8 en los pacientes LLC juegan un papel crucial en el preconditionamiento de los neutrófilos para liberar NETs.

Relación entre la producción de NETs y la progresión de la LLC.

Previamente se ha reportado que los niveles plasmáticos elevados de IL-8 en pacientes LLC correlacionan con mal pronóstico (149). Como mencionamos, nuestros resultados indican la existencia de una correlación positiva entre la capacidad formadora de NETs y la concentración de IL-8 plasmática. Teniendo en cuenta ambas observaciones decidimos

determinar si existía asociación entre los niveles de NETs y el estadio Binet de progresión de la leucemia. A tal fin, considerando los valores de actividad de elastasa y de ADN cuantificados se calculó la media aritmética y los datos fueron separados en función de la misma en dos grupos: ADN/Elastasa bajos y altos. Una vez segregados los datos relacionados a la formación de NETs se discriminó a los pacientes según pertenecieran al estadio A de Binet o a los estadios B o C. El estadio A comprende pacientes en las primeras fases de la enfermedad, mientras que los estadios B y C agrupa a los pacientes en etapas más avanzadas.

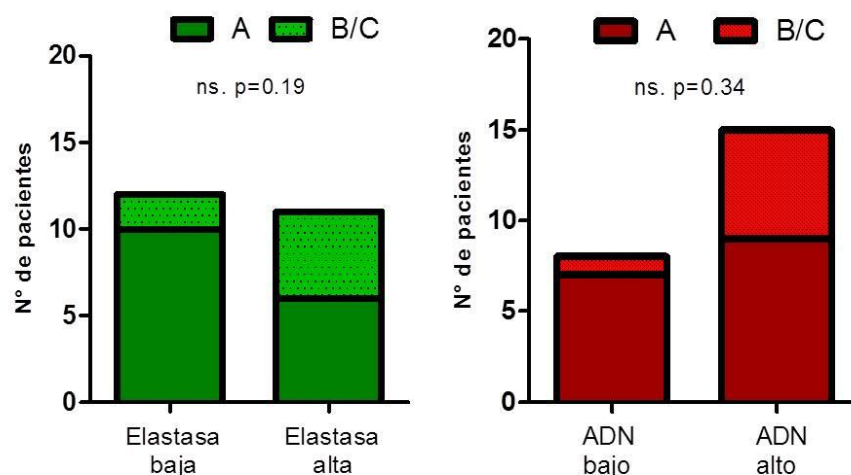


Figura 17. Capacidad de neutrófilos de pacientes en distintos estadios de progresión para formar NETs. Los valores obtenidos de la cuantificación de NETs se segregaron de acuerdo a la media aritmética en bajos y altos tanto para elastasa como para ADN, por otro lado los pacientes se dividieron en dos grupos según el estadio de Binet en que estuvieran (estadio A y estadio B/C). Se confeccionó una tabla de contingencia y se analizó la existencia de asociaciones entre las 4 variables categóricas. La significancia estadística se evaluó mediante el test de Fisher. ns= no significativo.

Los resultados de la Figura 17 indican que no se alcanzó una asociación estadísticamente significativa entre mayor capacidad de los neutrófilos de formar NETs y estadio de la enfermedad más avanzado, si bien existe una tendencia en este sentido. Sin embargo, puede observarse que los grupos de elastasa y ADN altos incluyen a la gran mayoría de los pacientes en estadios Binet B o C.

Como abordaje adicional decimos evaluar la concentración de ADN circulante en plasmas de pacientes LLC y compararla con la de plasmas de DS de edad similar (Fig. 18A), como así también si existe alguna diferencia en dicha concentración entre pacientes de bajo y de alto riesgo (Fig. 18B). La segregación entre ambos grupos se determinó siguiendo el criterio de expresión de CD38 y/o CD49d, siendo los pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo aquellos con un 30% o más de células leucémicas positivas para uno u otro de estos marcadores.

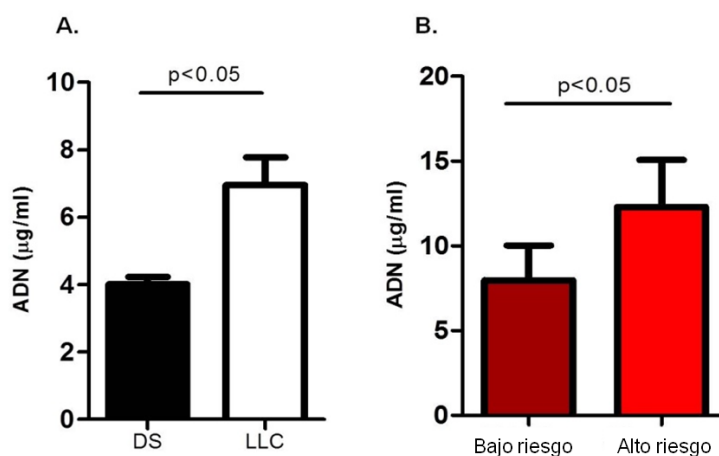


Figura 18. Niveles de ADN circulante en plasmas de pacientes LLC. Se cuantifico la concentración de ADN circulante en muestras de plasma DS y LLC (A), como así también se estableció la diferencia de dichos niveles entre pacientes de bajo y de alto riesgo (B). Se ilustra media + SEM para cada grupo (n: 23). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Mann-Whitney ($p=0.05$).

Se observó que el nivel de ADN circulante en los plasmas de pacientes LLC fue mayor respecto al detectado en plasmas de DS. A su vez al segregar los datos entre pacientes de bajo y de alto riesgo, se encontró que los últimos poseen una mayor cantidad de ADN circulante. Sin embargo, no podemos asegurar que la fuente principal de este ADN sean las NETs ya que podría provenir de la muerte de células malignas en la circulación. Será necesario cuantificar la expresión de histonas citruniladas en las muestras de plasma para corroborar que se trata de NETs. Muy recientemente se reportó el desarrollo de un ensayo de ELISA para la evaluación de histona H3 citrunilada(150) en plasma que esperamos poder utilizar para nuestras muestras.

Efecto de las NETs sobre la célula leucémica.

Inicialmente las NETs fueron descritas como un nuevo mecanismo microbicida de los neutrófilos. Sin embargo, con el paso del tiempo, estas estructuras se vieron implicadas en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades, siendo capaces de afectar la viabilidad y/o la activación de distintos tipos celulares (83, 151). Debido a este último aspecto y a nuestros resultados que sugieren que los neutrófilos de pacientes LLC exhiben una capacidad incrementada de formar NETs, decidimos evaluar si las mismas ejercen algún efecto sobre las células leucémicas. Para cumplimentar dicho objetivo indujimos la generación de NETs mediante la estimulación de los neutrófilos con ionomicina ($1\mu\text{M}$). En este caso no utilizamos PMA ya que en experimentos previos encontramos que no puede ser removido por completo de las preparaciones de NETs, por lo cual podría afectar a las células LLC llevando a conclusiones erróneas. La ausencia de ionomicina en las preparaciones de NETs se corroboró mediante ensayos de movilización de calcio (Fig. 19).

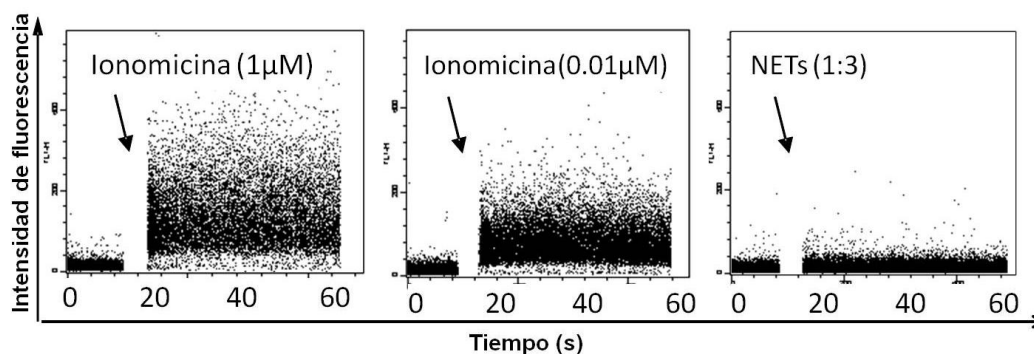


Figura 19. Evaluación de la movilización de calcio inducida por NETs generadas con ionomicina. Neutrófilos ($2 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados con ionomicina ($1\mu\text{M}$) por 1 h, lavados y reincubados durante 3 horas para permitir la liberación de NETs. Para evaluar la movilización de calcio intracelular por citometría de flujo se usaron neutrófilos de DS que se marcaron con el colorante Fluo-3AM durante 15 minutos. Luego de lavar se analizó la movilización de calcio gatillada por dos concentraciones de ionomicina y por la preparación de NETs diluida al tercio, tal como se utiliza en los cultivos con células LLC. Se muestran dot plots representativos. Las células fueron adquiridas durante 15 segundos, momento en el cual se agregó el estímulo y se analizó la movilización de calcio hasta llegar a los 60s. Las fluctuaciones en la concentración de calcio citoplasmático libre son identificadas con las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia del Fluo-3AM a lo largo del tiempo.

Una vez generadas las NETs se incorporaron a muestras de células mononucleares totales (CMT) (>95% de células LLC) provenientes de pacientes LLC en una relación volumen a volumen de 1:3 (NETs: medio). Las células leucémicas en presencia o no de las NETs fueron cultivadas durante 72 hs, tomándose muestras del cultivo a las 24, 48 y 72hs y realizando marcaciones de superficie con anticuerpos contra CD19 como indicador poblacional y anticuerpos contra CD69, CD86 y CD80 como indicadores de activación celular. A modo de control las células LLC también fueron incubadas con el sobrenadante de neutrófilos fijados con PFA y posteriormente estimulados con ionomicina siguiendo el mismo protocolo que aquellos neutrófilos productores de NETs. En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos. El panel A muestra los gráficos de *dot plot* de un experimento representativo donde puede verse que el agregado de NETs pero no del sobrenadante de neutrófilos fijados, incapaces de liberar NETs, induce el aumento en el número de células LLC (CD19⁺) que expresan marcadores de activación. En el panel B se grafican las IMF de cada uno de los marcadores expresados en las células leucémicas donde nuevamente se observa que las NETs inducen la activación de las mismas.

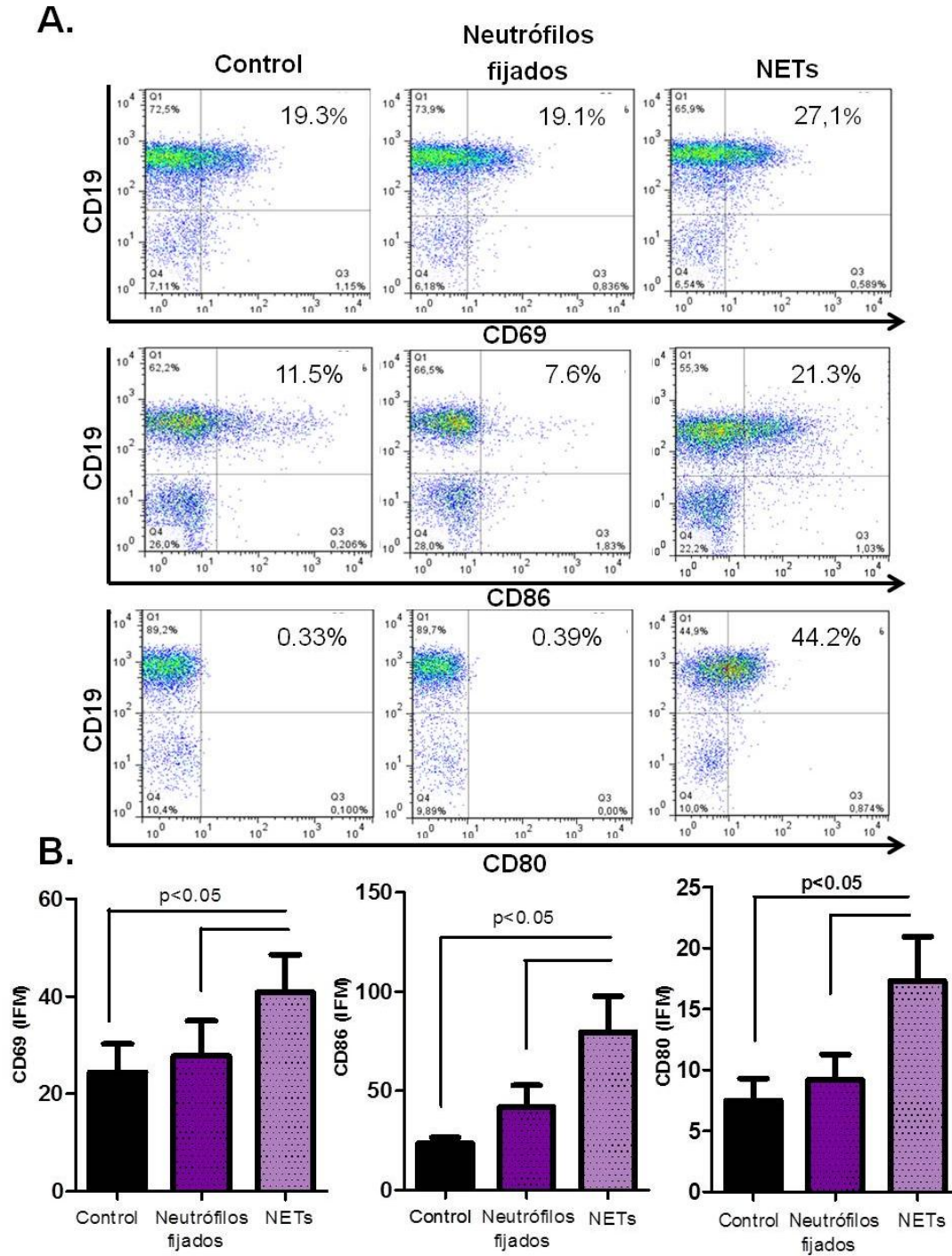


Figura 20. Expresión de marcadores de activación en respuesta a las NETs. CMTs LLC (>95% células LLC) se incubaron durante 72hs con NETs, sobrenadante de neutrófilos fijados y estimulados o medio de cultivo. A las 24, 48 y 72hs se evaluaron los marcadores de activación CD69, CD86 y CD80 respectivamente. **(A)** Dot plots representativos de las tres marcaciones en cada una de las condiciones experimentales. **(B)** Intensidad media de fluorescencia (IFM) para cada marcador, las barras representan las medias + SEM, n= 10. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido del posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

En función de los resultados observados decidimos evaluar si además de inducir la activación de las células leucémicas las NETs son capaces de modular la apoptosis de las mismas. A tal fin se realizaron co-cultivos de CMTs LLC (>95% de células leucémicas) en presencia o ausencia de NETs (1:3) durante 48hs. Luego de la incubación las células fueron marcadas con AnexinaV-FITC y con IP para evaluar los niveles de apoptosis por citometría de flujo (Fig. 21).

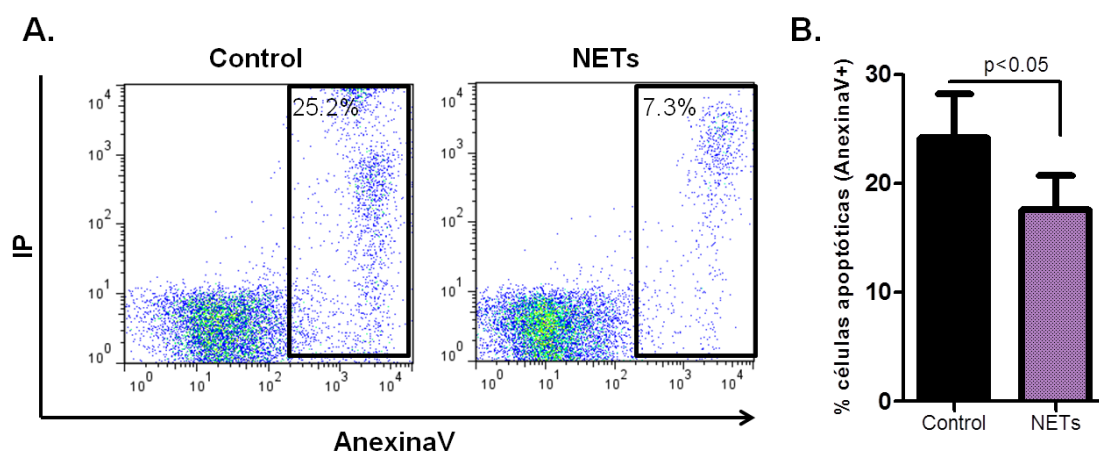


Figura 21. Inhibición de la apoptosis de las células LLC en presencia de NETs. CMTs LLC fueron cultivados en presencia o no de NETs durante 48hs. Luego de cumplido el periodo de incubación, las células se marcaron con AnexinaV y con IP. (A) *Dot plot* representativo de la marcación AnexinaV vs IP. (B) Cuantificación del porcentaje de células muertas (AnexinaV positivas) en ambas condiciones. Se ilustra la media \pm SEM de cada grupo (n=15). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Mann-Whitney.

Los resultados de estos experimentos mostraron que las NETs no solo activan a las células leucémicas sino también son capaces de retrasar su muerte.

Con la finalidad de establecer si estos efectos mediados por las NETs son específicos para las células B leucémicas, se purificaron linfocitos B de sangre periférica obtenida de DS y se cultivaron con o sin NETs. A las 24, 48 y 72 horas se analizó la expresión de los marcadores de activación previamente descriptos, y se evaluó el nivel de apoptosis a las 48 hs. Como se ilustra en la figura 22, las NETs no indujeron la activación de los linfocitos B de DS (Fig.22A) ni modificaron la apoptosis espontánea (Fig. 22B), sugiriendo que los

efectos previamente descriptos son específicos para las células B leucémicas de pacientes LLC.

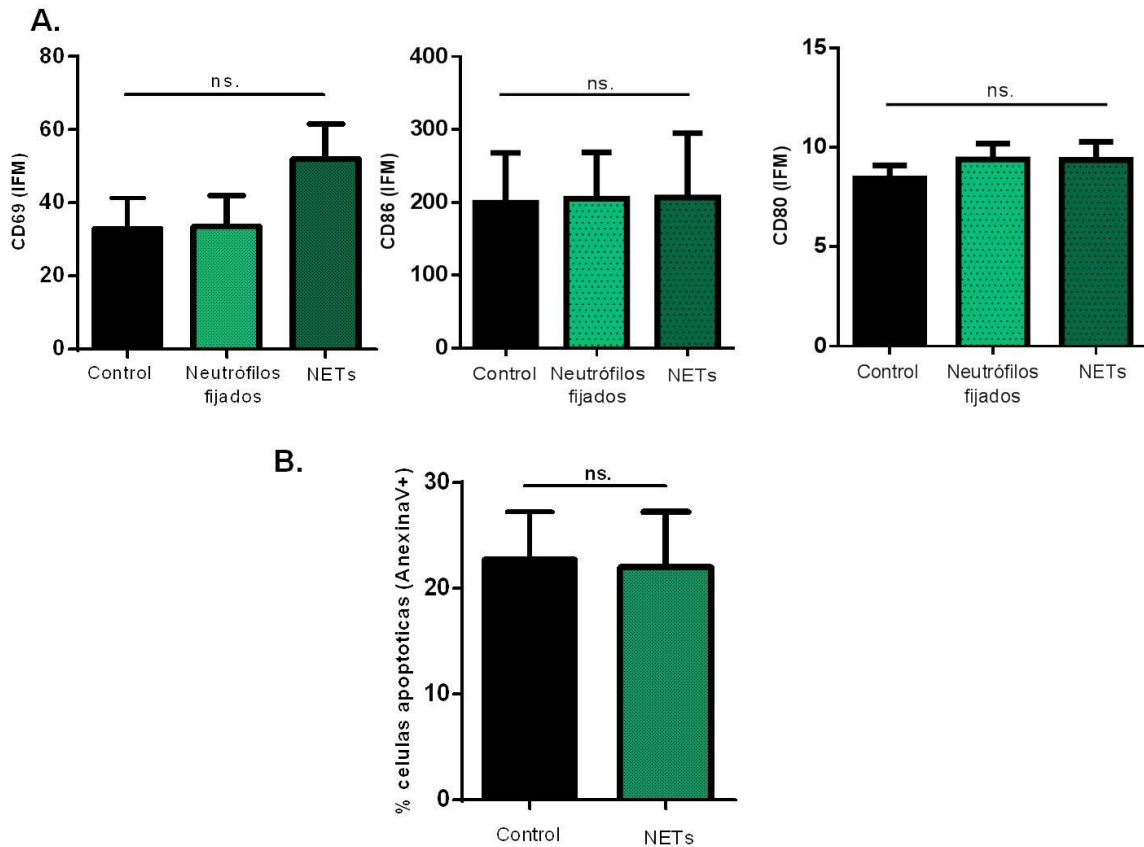


Figura 22. Efectos de las NETs sobre linfocitos B de dadores sanos. Se purificaron linfocitos B a partir de muestras de CMTs de dadores sanos y se cultivaron a una concentración de $1 \times 10^6/\text{ml}$ en presencia o no de NETs durante 72 hs. **(A)** Expresión de CD69, CD86 y CD80 (IFM) en células B evaluada a las 24, 48 y 72hs respectivamente. Se ilustra la media \pm SEM para cada condición (n=5). La significancia estadística se analizó mediante el test de Friedman. **(B)** Porcentaje de células AnnexinV positivas luego de 48 hs de cultivo en presencia y ausencia de NETs. Se ilustra la media \pm SEM para cada condición (n=5). La significancia estadística se evaluó mediante el test de Mann-Whitney.

RESULTADOS - PARTE II – Neutrófilos asociados a tumor en LLC.

Efecto de las células LLC sobre la viabilidad de los neutrófilos.

Como se señaló en la introducción, los neutrófilos constituyen una parte significativa del infiltrado inflamatorio en muchos tipos de cáncer, y en la mayor parte de los casos cumplen un rol netamente protumoral diferenciándose en neutrófilos N2. Considerando que se trata de células de vida media muy corta, para que los neutrófilos puedan adquirir un nuevo fenotipo es crucial que su sobrevivencia se vea incrementada. Teniendo esto en cuenta decidimos evaluar si las células LLC son capaces de prolongar la sobrevivencia de los neutrófilos. Para ello neutrófilos de DS fueron co-cultivados con células LLC durante 3 días. Se analizó, mediante citometría de flujo, la apoptosis de los neutrófilos a las 24, 48 y 72 horas marcándolos con AnexinaV-FITC (Fig. 23A-B). Los resultados obtenidos demuestran que las células LLC son capaces de prolongar significativamente la sobrevivencia de los neutrófilos *in vitro*. Con el objetivo de determinar si este efecto se relaciona con señales de contacto célula-célula o con factores solubles liberados por las células leucémicas se realizaron los co-cultivos en cámaras de transwell (Fig. 23C) y luego de 48 horas se analizó la apoptosis de los neutrófilos mediante citometría de flujo. El efecto inhibitorio de la apoptosis de los neutrófilos se observó tanto en los co-cultivos llevados a cabo en cámaras de transwell como cuando hubo contacto directo entre ambas poblaciones, lo que indica que el efecto inhibitorio de la apoptosis está mediado por factores solubles.

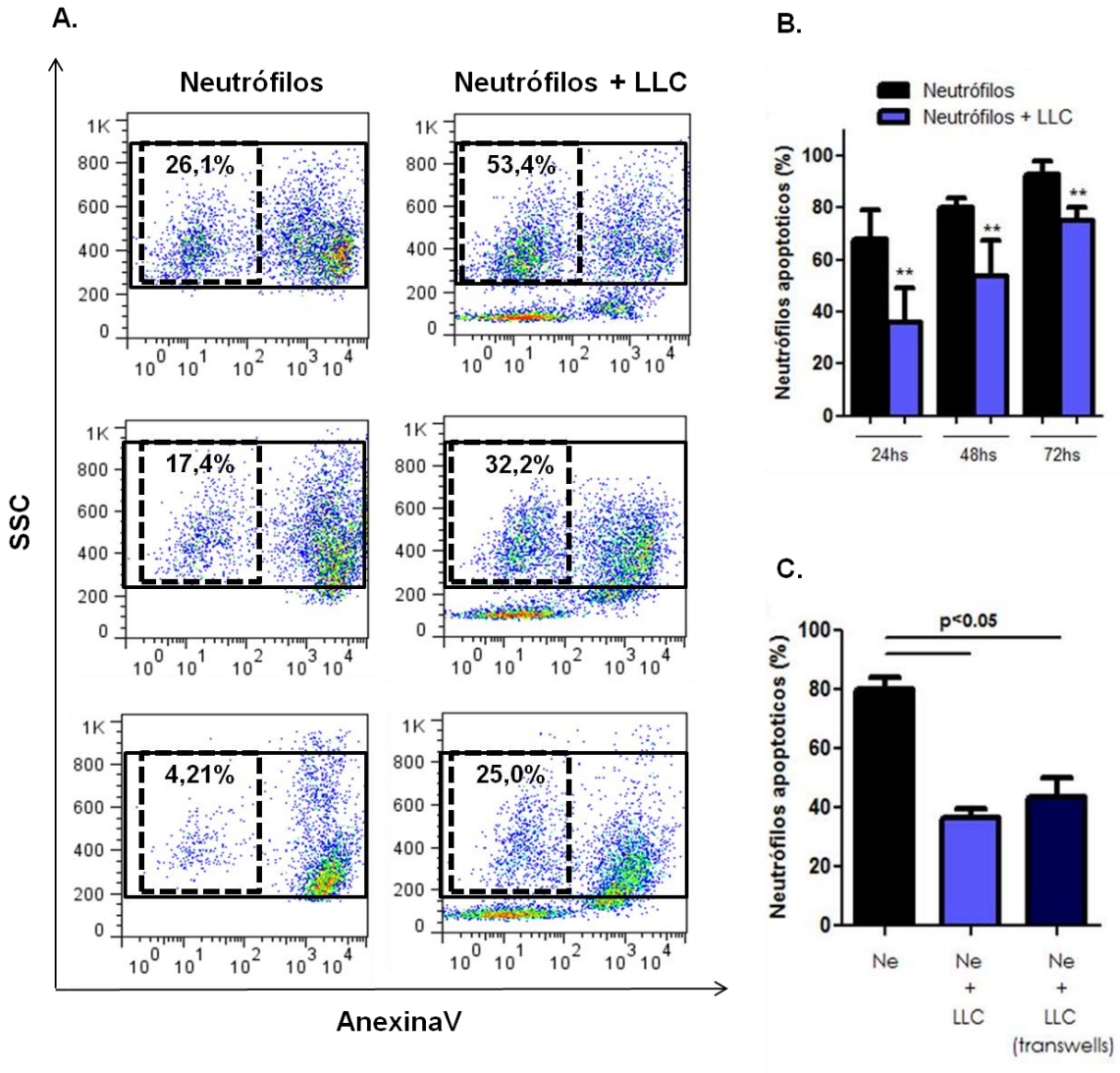


Figura 23. Evaluación de la apoptosis de neutrófilos co-cultivados con células LLC.

A. Neutrófilos ($2 \times 10^6/\text{ml}$) de DS fueron co-cultivados con células LLC ($2 \times 10^6/\text{ml}$) durante 72hs. A las 24, 48 y 72 hs se analizó la apoptosis de los neutrófilos por citometría de flujo mediante la marcación de Annexina V FITC. La población de neutrófilos se discriminó de la células leucémicas en los co-cultivos por su mayor complejidad granular (parámetro SSC). Se ilustran dot plots representativos de SSC vs AnnexinV (de arriba abajo: 24, 48 y 72 hs), señalándose el porcentaje de neutrófilos viables (Annexina V negativos). **B.** Se grafican las medias \pm SEM ($n = 7$) del porcentaje de neutrófilos apoptóticos en las distintas condiciones a lo largo del co-cultivo con las células leucémicas. **C.** Los co-cultivos fueron llevados a cabo en cámaras transwell durante 48hs, luego de las cuales se analizó por citometría de flujo la apoptosis de los neutrófilos. Se ilustra la media \pm SEM de 5 experimentos. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido por el test de múltiples comparaciones de Dunn's.

Modulación de la expresión de Bfl-1 por el medio condicionado LLC.

Recientemente Gätjen y colaboradores (152) reportaron que en el modelo murino de LLC E μ -TCL1, los neutrófilos esplénicos en contacto con células leucémicas exhiben una mayor sobrevivencia y expresan mayores niveles de proteínas antiapoptóticas. Un trabajo anterior, al analizar la expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico entre células mieloides supresoras granulocíticas y TANs, observó que el único gen cuya expresión aumenta de manera diferencial entre ambos grupos corresponde a la proteína antiapoptótica Bfl-1. En base a estos reportes se decidió determinar si la inhibición de la apoptosis de los neutrófilos de DS mediada por las células LLC se asocia con un incremento en la expresión de Bfl-1. Para ello se incubaron neutrófilos de DS durante 24 horas con medio condicionado de células LLC, obtenido a partir del cultivo de células leucémicas (1×10^6 células/ml) durante 48hs. La expresión de Bfl-1 se evaluó por western blot. En la Figura 24 se muestran los resultados representativos obtenidos a partir de una muestra de neutrófilos de DS y 3 muestras de medio condicionado de células LLC provenientes de pacientes distintos. Resultados similares se observaron empleando neutrófilos de otras dos muestras de DS.

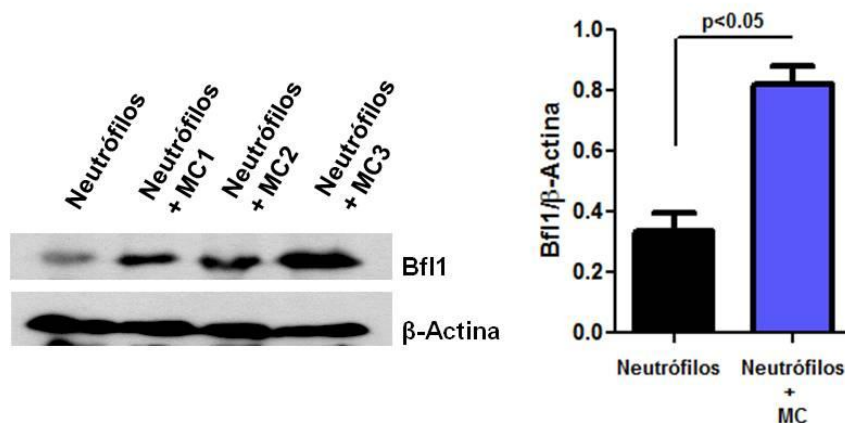


Figura 24. Expresión de Bfl1 en neutrófilos cultivados con medio condicionado por células LLC. Se cultivaron neutrófilos (5×10^6) durante 24hs en el medio condicionado (MC) de células LLC. La expresión de Bfl1 se evaluó por western blot. La actina se empleó como control de carga. Se muestra un ejemplo representativo y la relación Bfl1/actina (media \pm SEM). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Mann-Whitney.

Los resultados mostraron que el medio condicionado por las células LLC aumenta la expresión de Bfl-1 en neutrófilos DS.

Análisis de la participación de IL-10 y TGF- β en la actividad antiapoptótica de las células LLC sobre los neutrófilos.

Varios grupos han descripto previamente la relevancia del TGF- β y la IL-10 producidas por las células tumorales en la reprogramación de los neutrófilos a TANs(106, 152). Con la finalidad de determinar si estas citoquinas son responsables de prolongar la sobrevivencia de los neutrófilos de DS generada por las células LLC, evaluamos en primera instancia su presencia en los sobrenadantes de los co-cultivos a las 24hs como así también en sobrenadantes de neutrófilos solos y células LLC solas luego del mismo periodo de cultivo (Fig. 25A). Observamos la presencia de TGF- β e IL-10 en el sobrenadante del co-cultivo y en el de las células LLC solas. En los sobrenadantes de neutrófilos cultivados solos no se encontró IL-10 pero sí concentraciones muy bajas de TGF- β . De estos resultados puede inferirse que estas citoquinas son producidas mayoritariamente o exclusivamente por las células B leucémicas.

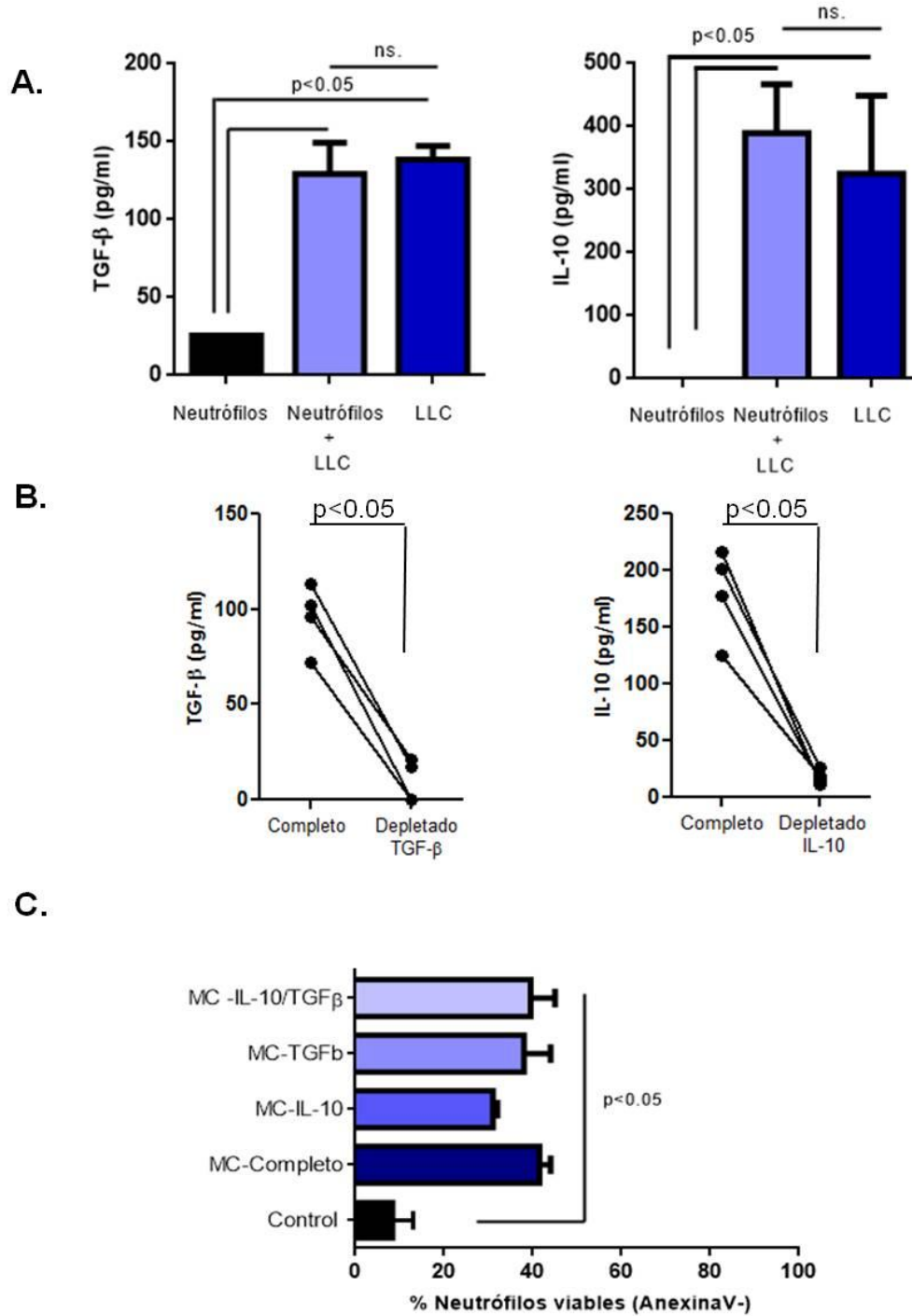


Figura 25. IL-10 y TGF-β presentes en el medio condicionado de células LLC no son responsables del efecto antiapoptótico sobre neutrófilos. **A.** Niveles de IL-10 y TGF-β en los sobrenadantes de neutrófilos, células LLC o el co-cultivo de 24hs medidos por ELISA. Media \pm SEM, n= 6. **B.** Niveles de cada citoquinas antes y después del paso de depleción. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Mann-Whitney. **C.** Apoptosis de neutrófilos incubados con el medio condicionado (MC) completo y depletado de IL-10 y TGF-β. La significancia estadística se obtuvo realizando el test de Friedman seguido del posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Luego de confirmar la presencia de TGF- β e IL-10 en los sobrenadantes del co-cultivo, procedimos a su depleción del mismo modo que lo descrito para IL-8 en el capítulo I de resultados (Fig. 25 B). Los sobrenadantes completos y los depletados de TGF- β e IL-10 fueron empleados para cultivar neutrófilos durante 24 horas y analizar los niveles de apoptosis (Fig. 25 C). Los resultados mostraron que la depleción de IL-10 y TGF- β no impide que el medio condicionado por las células LLC inhiba la apoptosis de los neutrófilos lo que sugiere que son otros los factores involucrados en dicho fenómeno.

Si bien IL-10 y TGF- β demostraron no estar involucradas en el proceso de inhibición de la apoptosis de neutrófilos inducido por las células leucémicas, podrían participar en la reprogramación de los neutrófilos a TANs, tal como ha sido reportado en el modelo murino de LLC(152). Es por ello que, en primer lugar, se evaluaron los niveles de expresión de CD16 y CD62L en los neutrófilos de DS que permanecen viables luego de ser cultivados por 24 horas con o sin medio condicionado de células LLC. El análisis se hizo por citometría de flujo discriminando los neutrófilos muertos con Anexina V (Fig. 26 A-B).

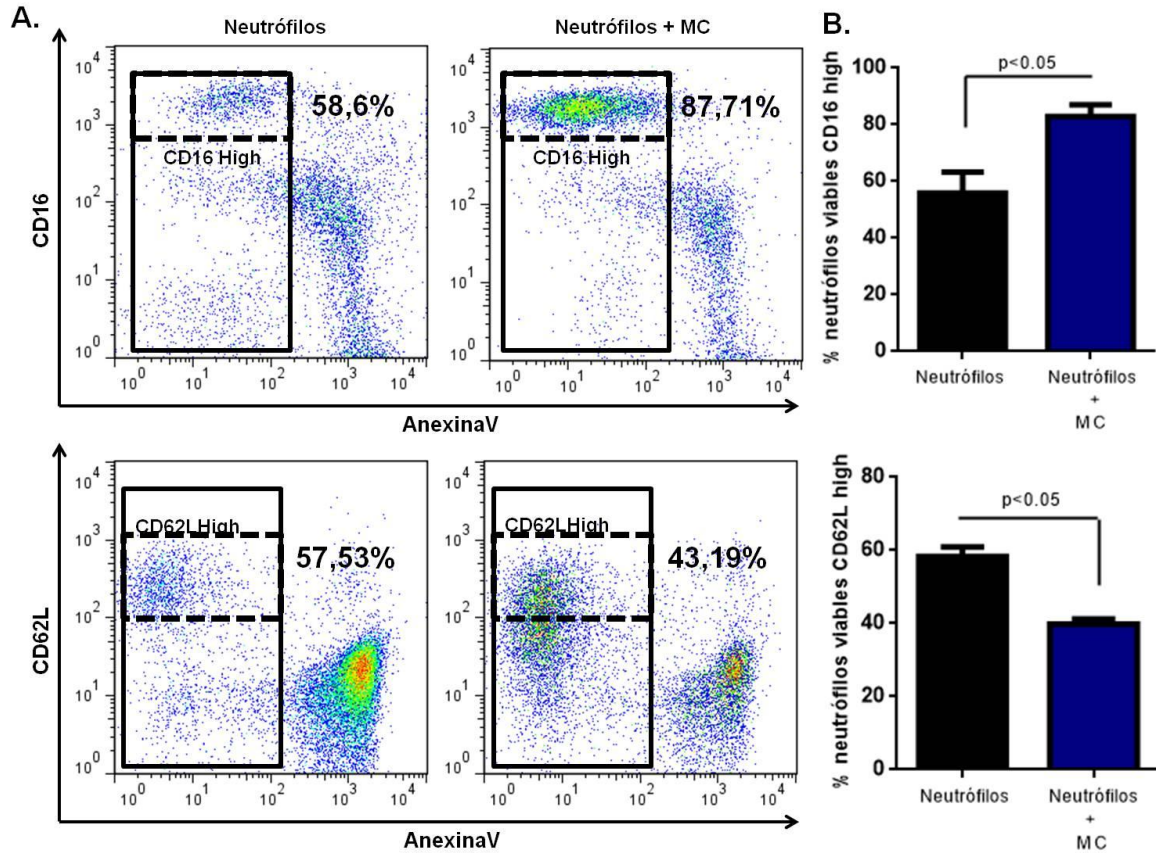


Figura 26. Modulación de la expresión de CD16 y CD62L en neutrófilos inducida por el medio condicionado LLC. Neutrófilos de DS fueron incubados durante 24hs con medio condicionado LLC o medio control. La expresión de CD16 y CD62L en los neutrófilos viables (AnexinaV negativos) se analizó por citometría de flujo. **A.** Dot plots representativos de los marcadores CD16 y CD62L vs. AnexinaV, el rectángulo con línea continua determina la región de neutrófilos viables, el rectángulo con línea punteada determina los neutrófilos viables con alta expresión (High) para cada marcador. **B.** Se muestra la media \pm SEM del porcentaje de los neutrófilos viables High para CD16 y CD62L en cada condición. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Mann-Whitney.

Observamos que luego de 24 horas de cultivo de neutrófilos de DS con medio condicionado LLC, la mayoría de los neutrófilos viables resultaron CD16^{high}, registrándose un incremento respecto del porcentaje correspondiente al control. Por el contrario, el porcentaje de neutrófilos viables CD62L^{high} disminuyó respecto a los neutrófilos incubados sin medio condicionado (Fig. 26A-B). Estos resultados sugieren que el medio condicionado de células B leucémicas promueve la diferenciación de los neutrófilos en un fenotipo TAN.

Una vez que comprobamos que el medio condicionado LLC fue capaz de modular la expresión de ambos marcadores, se evaluó si dependía de la presencia de IL-10 y TGF- β . Para ello, incubamos neutrófilos de DS durante 24 horas con los medios condicionados completos o depletados de una o de ambas citoquinas y se analizó la expresión de CD16 y CD62L en las células viables por citometría de flujo (Fig. 27A-B).

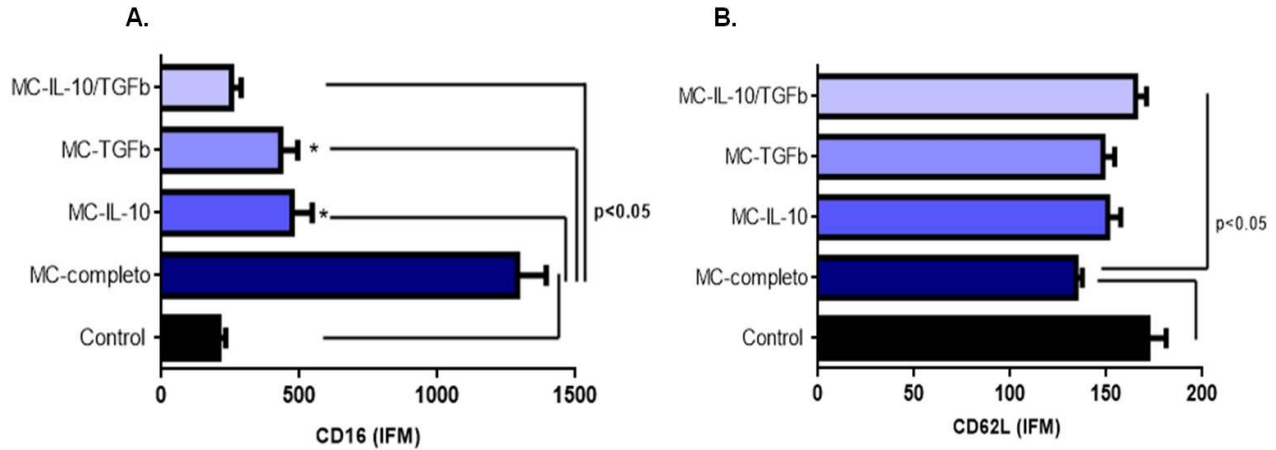


Figura 27. Efecto del TGF- β e IL-10 sobre la expresión de CD16 y CD62L. Neutrófilos de DS fueron incubados durante 24 hs en presencia de medio condicionado (mc) completo, mc depletado de IL-10, mc depletado de TGF- β o mc depletado de IL-10 y TGF β . Luego se analizó por citometría de flujo la expresión de CD16 (**A**) y CD62L (**B**) en los neutrófilos en las distintas condiciones. Se ilustra la media + SEM de la IFM de ambos marcadores en neutrófilos incubados con los distintos mc. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Los resultados demostraron que los medios condicionados depletados de estas citoquinas poseían una menor capacidad de modular la expresión de ambos marcadores. Como puede observarse, en ausencia de IL-10 y TGF- β el medio condicionado no aumenta la expresión de CD16 ni disminuye la de CD62L significativamente. El efecto es más evidente cuando se deplecionan ambas citoquinas. Estos resultados refuerzan el papel clave de IL-10 y TGF- β secretada por las células LLC en la reprogramación de los neutrófilos.

RESULTADOS - PARTE III –Propiedades protumorales del péptido antimicrobiano LL37 en LLC.

El péptido LL37 inhibe la apoptosis espontánea de las células leucémicas.

Como se describió en la introducción el péptido LL37 liberado a la circulación durante las infecciones y también presente en las NETs actúa como una señal protumoral en el microambiente de diferentes tipos de tumores sólidos(153-155). Teniendo en cuenta la alta incidencia de infecciones bacterianas en los pacientes LLC como así también nuestros propios resultados que dan cuenta de una NETosis exacerbada en esta patología, se investigó en primer lugar si el LL37, agregado en forma exógena, modifica la apoptosis de las células leucémicas. A tal fin se incubaron CMTs de pacientes LLC (>95% células LLC) con distintas concentraciones del péptido recombinante y se evaluó el nivel de apoptosis espontánea a las 48 horas mediante la marcación de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio (IP). Un experimento representativo se muestra en la Figura 28A.

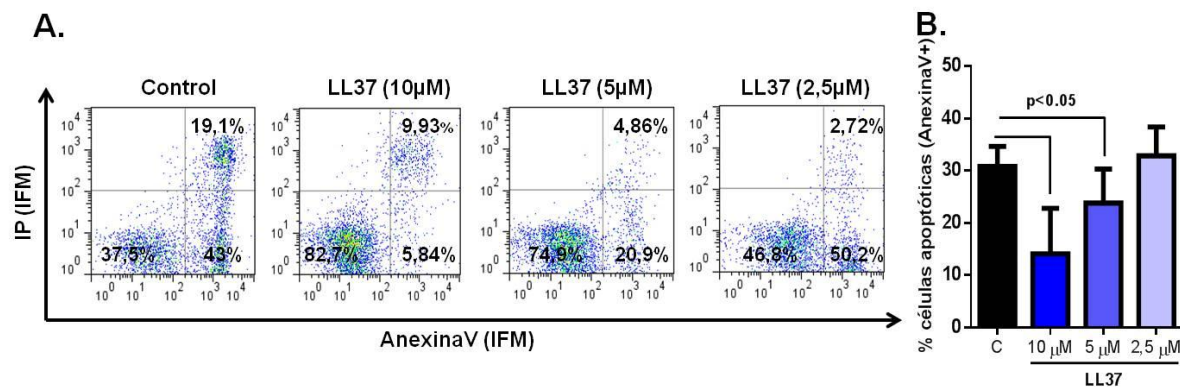


Figura 28. Efecto del LL37 sobre la apoptosis espontánea de las células LLC. CMTs LLC (>95% células LLC) fueron cultivados en presencia de distintas concentraciones del péptido LL37 durante 48hs. Transcurrido dicho periodo se analizó la apoptosis espontánea por citometría de flujo. **A-** Dot plots representativos de las marcaciones AnexinaV/IP, mostrando los porcentajes de células muertas (AnexinaV⁺ y doble positivas) y viables. **B-** Se representa la media ± SEM del porcentaje de células apoptóticas de los controles y para cada concentración de LL37 (n=10). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido del postest de múltiples comparaciones de Dunn's (p=0.05).

Los resultados mostraron que LL37 a concentraciones de 5 y 10 μM , compatibles de ser alcanzadas localmente en tejidos durante las infecciones (156), es capaz de inhibir la apoptosis espontánea de las células LLC (Fig. 28B).

EL péptido LL37 inhibe la apoptosis de las células leucémicas inducida por fludarabina.

El tratamiento estándar para los pacientes LLC combina el uso del análogo de adenosina, fludarabina, con el anticuerpo monoclonal anti-CD20, Rituximab y el agente alquilante ciclofosfamida. La fludarabina induce la apoptosis de las células leucémicas en forma directa, mientras que la ciclofosfamida debe ser metabolizada en el hígado para generar el metabolito citotóxico. Para determinar si el LL37 es capaz de inhibir no sólo la apoptosis espontánea si no también la inducida por drogas antineoplásicas, se incubaron las CMTs LLC con fludarabina (12.5 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o no de LL37 5 μM (Fig. 29).

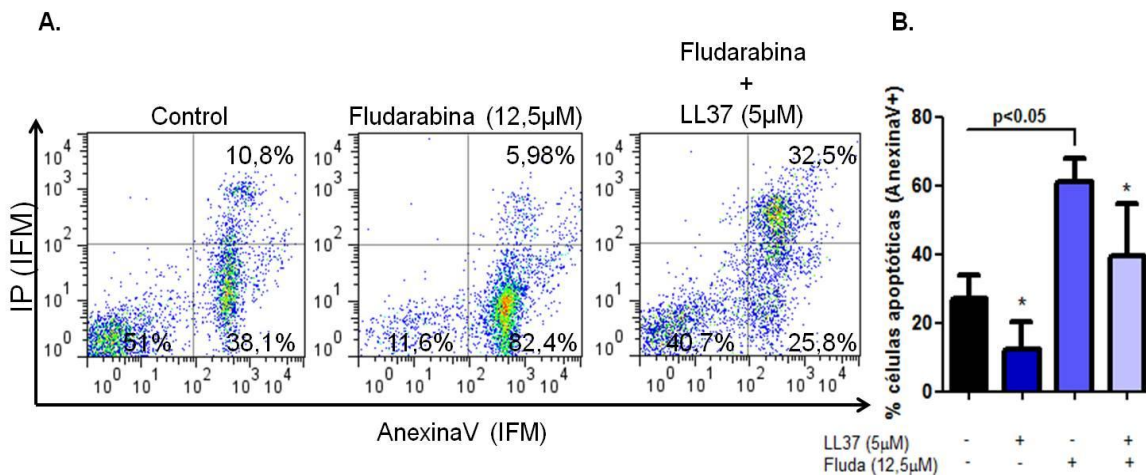


Figura 29. Efecto del LL37 sobre la apoptosis inducida por fludarabina en células LLC. CMTs LLC (>95% células LLC) fueron expuestas a fludarabina (12,5 μM) por 48 hs, en presencia o no de LL37 (5 μM). La apoptosis se analizó por citometría de flujo. **A-** Se muestran los dot plots de las marcaciones Annexin V/IP de un experimento representativo. **B-** Se representa la media \pm SEM del porcentaje de células apoptóticas en la condición control y tratadas con fludarabina en presencia o ausencia de LL37 (n=10). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido del posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. El * indica significativamente menor que la condición correspondiente sin LL37 para cada caso.

Al igual que lo observado para la apoptosis espontánea, el LL37 fue capaz de reducir significativamente la apoptosis de las células leucémicas inducida por fludarabina.

El péptido LL37 incrementa la expresión de BCL-2 e inhibe la activación de caspasa-3.

La proteína antiapoptótica BCL-2 se encuentra sobreexpresada en las células LLC y disminuye por tratamiento con fludarabina. Por otro lado, la activación de la caspasa-3 es un evento crítico en el programa apoptótico gatillado por fludarabina sobre las células B leucémicas. Por lo tanto decidimos evaluar por western blot el efecto de LL37 sobre la expresión de BCL-2 y de caspasa-3 clivada. Los resultados se muestran en la Figura 30.

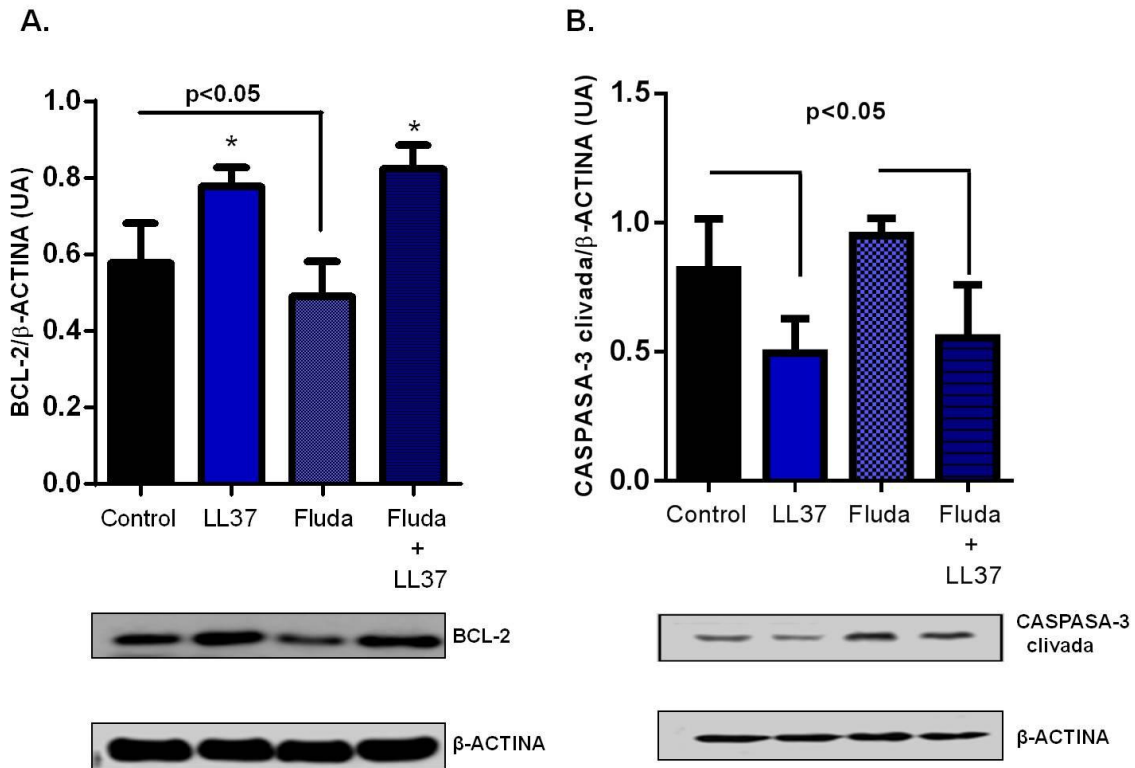


Figura 30. Expresión de BCL-2 y de caspasa-3 clivada en células leucémicas tratadas con LL37. Células LLC (5×10^6) fueron cultivadas durante 48hs con Fludarabina y LL37 (5μM). Los extractos proteicos fueron analizados por WB. Expresión de BCL-2 (A) y de caspasa-3 clivada (B), mostrando la media \pm SEM, n=5. La expresión de cada proteína se expresa de manera relativa a la expresión de β-actina en unidades arbitrarias (UA). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido del posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. El * indica significativamente distinto en relación a la condición sin LL37.

Del análisis de los resultados obtenidos por western blot se pudo determinar que la acción antiapoptótica del LL37 se relaciona con un incremento en la expresión de BCL-2 como así también con un descenso en los niveles de clivaje de caspasa-3.

La actividad antiapoptótica de LL37 en células LLC no depende de FPRL-1 o P2X7R

Previamente se ha reportado que la actividad antiapoptótica del LL37 sobre los neutrófilos ocurre a través de la interacción del péptido con dos tipos de receptores: el receptor FPRL-1 (de sus siglas en inglés *Formyl-Peptide Receptor-Like 1*) y el receptor de purinas P2X7 (131). P2X7 se expresa en las células LLC (157), pero aún no se conoce si FPRL-1 también está presente. Para determinar si la inhibición de la interacción de LL37 con estos receptores reduce su actividad antiapoptótica en células LLC, las mismas se preincubaron con WRW4 (1µM), un antagonista del FPRL-1 y/o con KN-62 (1µM), un inhibidor de P2X7R durante 30 minutos para luego agregar LL37. A las 48 horas se determinaron los niveles de apoptosis espontánea (Fig. 31). Cabe resaltar que en resultados preliminares no mostrados se testearon concentraciones más altas de ambos inhibidores (10 y 5 µM), pero se descartaron por ser citotóxicas para las células LLC.

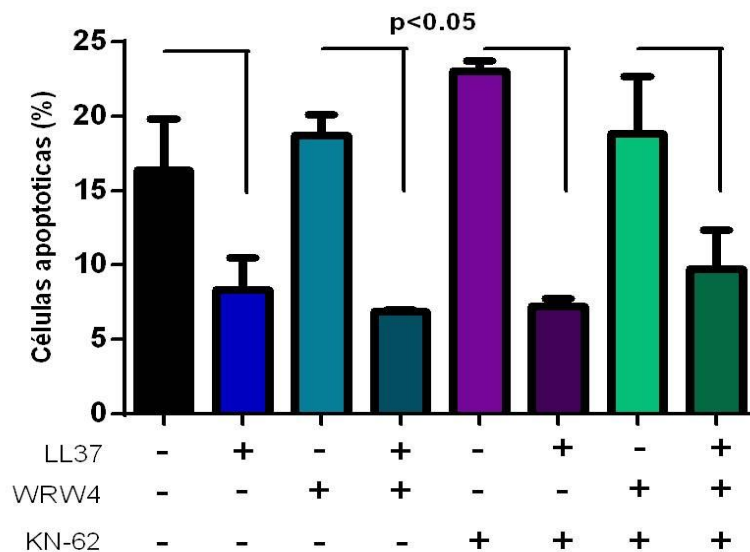


Figura 31. Efecto del bloqueo de los receptores FPRL1 y/o P2X7 sobre la inhibición de la apoptosis mediada por el LL37. Células LLC fueron preincubadas con WRW4 y/o KN-62 ambos a una concentración de 1 μ M y luego estimuladas con LL37 (5 μ M) durante 48 hs. Concluido el periodo de incubación las células se marcaron con AnexinaV/IP y se determinó el porcentaje de células apoptóticas. Se ilustra la media \pm SEM de cada grupo (n=3). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's (p=0.05).

Los resultados indicaron que los inhibidores de P2X7R y de FPRL1 no bloquearon el efecto antiapoptótico mediado por LL37 sobre las células leucémicas.

Interacción del péptido LL37 con CXCR4.

Como se señalara en la Introducción, LL37 exacerba la quimiotaxis de precursores hematopoyéticos humanos hacia CXCL12 actuando vía CXCR4. (136). Teniendo en cuenta estas observaciones y considerando la relevancia que posee el eje CXCL12/CXCR4 en la fisiología de las células LLC, decidimos evaluar si el LL37 era capaz de incrementar la quimiotaxis de células LLC hacia CXCL12. En paralelo, analizamos la expresión de membrana de CXCR4 ya que se sabe que la interacción de un receptor de quimiocina con su respectivo ligando conduce a la internalización del complejo. Para evaluar el efecto de LL37 sobre la quimiotaxis, células LLC fueron

sembradas en cámaras transwell y estimuladas con CXCL12 (25ng/ml) en presencia o ausencia de LL37 (5 μ M). Pasadas 2 horas, se cuantificó el número de células LLC que migraron a la cámara inferior del transwell. Para determinar si LL37 induce internalización de CXCR4, células LLC se incubaron con el péptido (5 μ M), analizándose la expresión de superficie de CXCR4 5, 10 y 25 minutos después del agregado del péptido. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

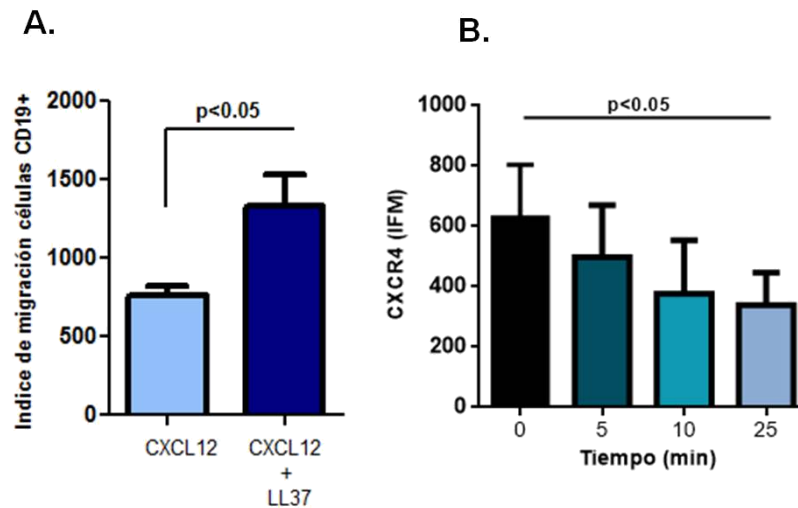


Figura 32. Interacción LL37-CXCR4 en las células leucémicas. **A-** Células LLC (2×10^6 cel/ml) fueron sembradas en la cámara superior de placas transwell para evaluar su migración al compartimiento inferior en respuesta a CXCL12 (25ng/ml) en presencia o no de LL37 (5 μ M). Luego de 120 minutos se cuantificó por citometría de flujo la cantidad de células que accedieron a la cámara inferior del transwell en cada condición. **B-** Células leucémicas (2×10^6 cel/ml) fueron incubadas con LL37 (5 μ M) a 37°C evaluándose por citometría de flujo la expresión del CXCR4 en la superficie de las células LLC a los 0, 5, 10 y 25 min de incubación. La barra indica que el nivel de expresión de CXCR4 en todos los tiempos es significativamente menor que en el tiempo cero. La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's. Se grafica la media \pm SEM de 5 experimentos.

Al analizar los resultados obtenidos se observó que, al igual que lo descripto para los precursores hematopoyéticos, el LL37 es capaz de incrementar la quimiotaxis de las células leucémicas en respuesta a CXCL12. Además se encontró que, en respuesta al LL37, la expresión en superficie del CXCR4 disminuye progresivamente indicando que el receptor es internalizado por las células LLC.

Teniendo en cuenta estos resultados decidimos evaluar si el bloqueo del CXCR4 con un anticuerpo monoclonal específico impide que el LL37 ejerza su acción antiapoptótica. A tal fin preincubamos células LLC (2×10^6 células/ml) con el anticuerpo α -CXCR4 (10 μ g/ml) durante 30 minutos y luego agregamos LL37 (5 μ M). Luego de 24 horas de cultivo se analizó la viabilidad de las células por citometría de flujo (Fig. 33).

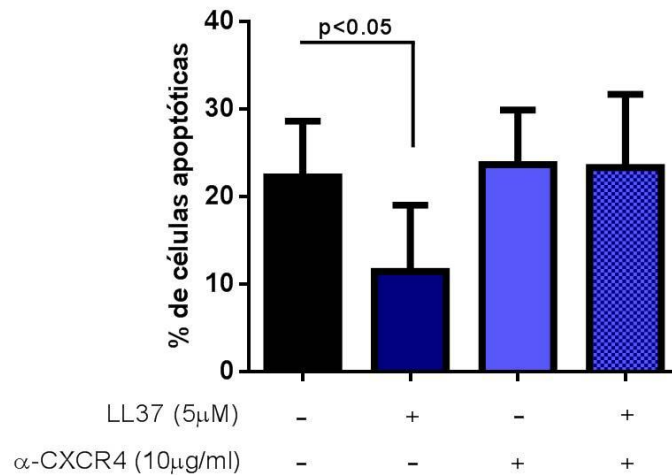


Figura 33. Efecto del bloqueo de CXCR4 sobre la acción antiapoptótica del LL37. Células LLC (2×10^6 /ml) fueron preincubadas con un anticuerpo α -CXCR4 durante media hora y luego fueron cultivadas en presencia del LL37 durante 24 horas. El nivel de apoptosis se evaluó por citometría de flujo. Se ilustran las medias \pm SEM ($n=6$). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido del posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Los resultados mostraron que el anticuerpo α -CXCR4 bloqueó en forma completa la protección que ejerce LL37 sobre las células LLC, de manera que el porcentaje de células LLC apoptóticas en presencia del anticuerpo y LL37 fue comparable a la apoptosis control.

Paralelamente, para confirmar la interacción del LL37 con el CXCR4 se incubaron células LLC con LL37 durante 30 minutos y se utilizó un anticuerpo específico dirigido contra el

péptido junto con un anticuerpo anti-CXCR4 para analizar la localización de ambas moléculas por microscopía confocal (Fig. 34).

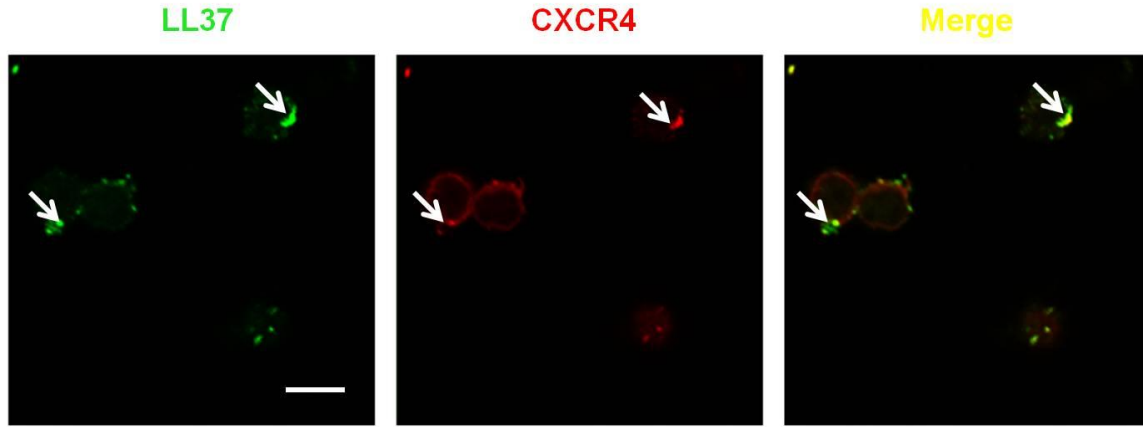


Figura 34. Análisis de colocalización entre LL37 y CXCR4 en la superficie de células LLC. Células LLC fueron incubadas durante 30 min con LL37 y luego fijadas con una solución de PFA 4% y marcadas con anti-LL37 hecho en conejo seguido de Ig-anti-conejo Alexa 488 (verde) y anti-CXCR4-PE (rojo). Las áreas de colocalización se indican con las puntas de flecha. La barra indica 15µm.

Las micrografías revelaron la existencia de áreas de colocalización de ambas señales fluorescentes en la membrana plasmática de las células leucémicas lo cual, junto con los resultados anteriores, sugiere que CXCR4 es al menos uno de los receptores relevantes para LL37 en las células LLC.

Efecto del LL37 sobre el estado de activación de la célula leucémica.

Con la finalidad de observar si el efecto antiapoptótico mediado por el péptido LL37 se asocia con un cambio en el estado de activación de la célula B leucémica, evaluamos por citometría de flujo la expresión de marcadores de activación (CD69, CD80, CD86 y HLA-DR) en la superficie de células LLC incubadas durante 48 horas con LL37 (5µM) (Fig.35).

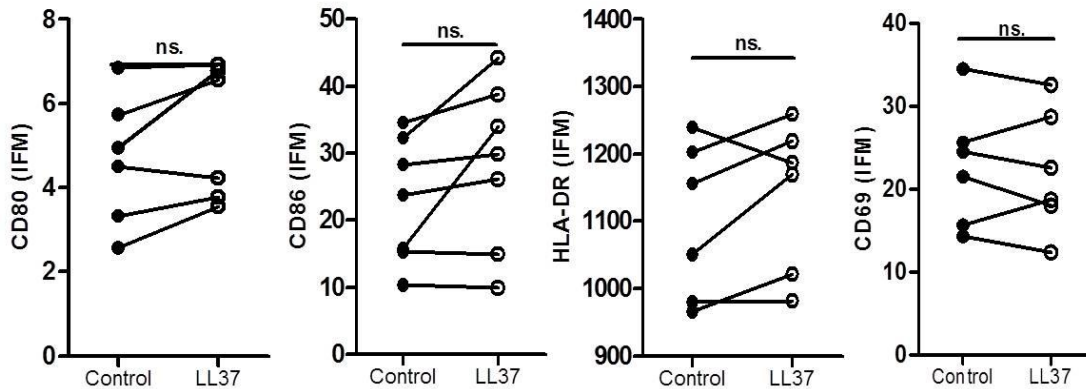


Figura 35. Modulación de la expresión de marcadores de activación en respuesta a la incubación con LL37. Células LLC (2×10^6 células/ml) fueron incubadas con LL37 (5 μ M) durante 48hs. Luego se analizó por citometría de flujo la expresión de CD69, CD80, CD86 y HLA-DR en la superficie de las células leucémicas. Se muestran los valores de la expresión control y en presencia de LL37 para cada paciente analizado (n=6). La significancia estadística se evaluó mediante el test de Mann-Whitney.

La incubación de las células LLC con LL37 parece no aumentar la expresión de marcadores de activación aunque debería incrementarse el número de muestras para llegar a una conclusión definitiva.

LL37 como potenciador de la activación celular inducida por ADN-CpG.

Previamente se ha reportado que el péptido LL37 es capaz de facilitar la internalización de ADN en monocitos promoviendo su activación mediada a través de TLR-9(151). Dado que las células LLC expresan TLR-9(158) y teniendo en cuenta nuestros resultados que indican una mayor concentración de ADN circulante en los pacientes LLC decidimos evaluar si el péptido es capaz de inducir la activación de las células LLC expuestas a concentraciones subóptimas de ADN-CpG. A tal fin se incubaron células LLC con ADN-CpG en presencia o ausencia de LL37 durante 24hs y se analizó la expresión de CD86 y HLA-DR por citometría de flujo (Fig. 36).

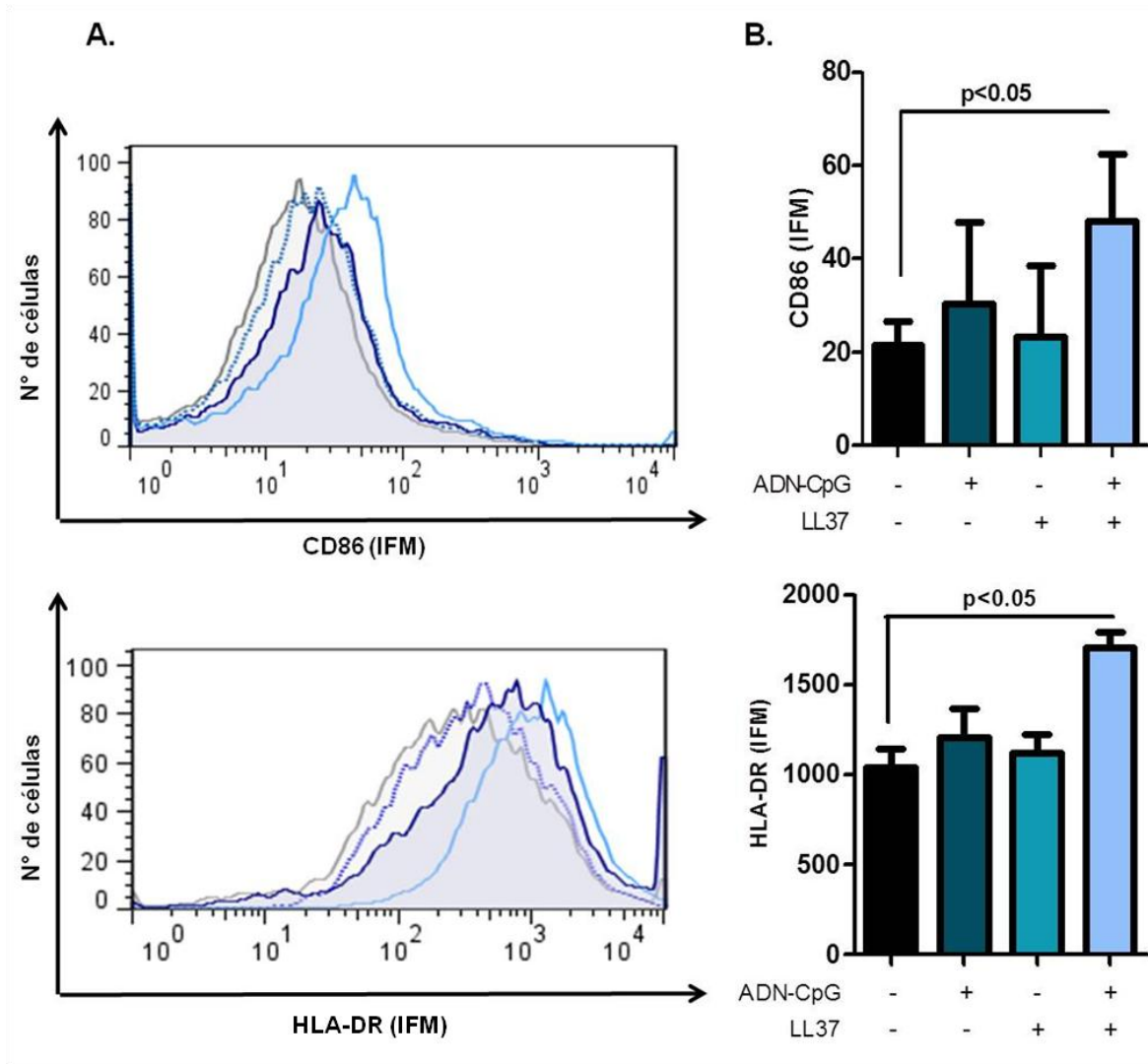


Figura 36. Modulación de la expresión de marcadores de activación en respuesta a ADN-CpG en presencia de LL37. Células LLC (2×10^6 células/ml) fueron estimuladas con ADN-CpG (5 μ M) en presencia o ausencia de LL37 (5 μ M) durante 24 hs, luego se analizó por citometría de flujo la expresión de CD86 y HLA-DR. **A-** Se muestran histogramas representativos para CD86 (superior) y para HLA-DR (Inferior). Se grafica control (gris), células tratadas con LL37 (línea punteada), con ADN-CpG (Azul) y con ADN-CpG + LL37 (Celeste). **B-** Se ilustra la IFM para cada marcador (media \pm SEM) (n= 10). La significancia estadística se obtuvo a través del test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Los resultados mostraron que sólo cuando se compleja el ADN-CpG en concentraciones subóptimas con LL37 se induce el aumento en la expresión de CD86 y de HLA-DR en las células B leucémicas.

Con la finalidad de evaluar si esta mayor activación está relacionada con una internalización más rápida del ADN-CpG en presencia del LL37, se incubaron células LLC con ADN-CpG-FITC en presencia o ausencia de LL37 y luego fueron analizadas por citometría de flujo (Fig.37).

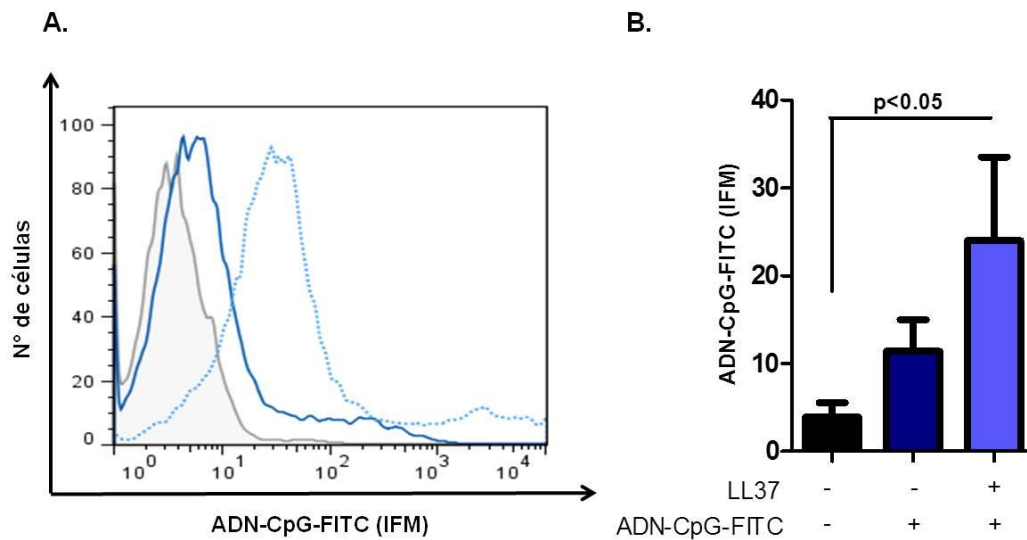


Figura 37. Internalización de ADN-CpG por parte de las células leucémicas en presencia de LL37. Células LLC fueron incubadas en presencia de CpG-FITC con y sin LL37 durante 30 minutos. Transcurrida la incubación las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. **A-** Se muestra un histograma representativo donde se observan las células control (Gris), las tratadas con CpG-FITC (Azul) y las tratadas con CpG-FITC + LL37 (celeste punteada). **B-** Se ilustra la media \pm SEM de la IFM del CpG-FITC para cada condición (n=5). La significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido por el posttest de múltiples comparaciones de Dunn's.

Al igual que lo reportado previamente en monocitos, el LL37 favorece la internalización del ADN-CpG a las células leucémicas y de esta forma estaría promoviendo la interacción del ligando con sus receptores de activación.

Neutrófilos como fuente de LL37.

La cantidad de trabajos que describen al péptido LL37 como una señal protumoral crece día a día. En la mayoría de ellos se describe a los macrófagos asociados a tumor (TAMs) como la principal fuente del LL37 en el microambiente tumoral (140). Se ha descrito que los macrófagos son capaces de incrementar la producción y secreción del péptido en respuesta a señales provenientes de las células tumorales (140). Teniendo en cuenta la capacidad de producir y liberar LL37 que poseen los neutrófilos en contextos infecciosos, decidimos evaluar si las células leucémicas son capaces de inducir la secreción del LL37 por parte de los mismos. Con dicho objetivo se co-cultivaron células LLC con neutrófilos durante 48 horas, se colectaron los sobrenadantes y se procedió a analizar la presencia de LL37 en los mismos mediante la técnica de dot blots (Fig. 38A). De manera adicional se evaluó mediante citometría de flujo el contenido de LL37 en neutrófilos cultivados solos como en neutrófilos cocultivados con células LLC o medio condicionado LLC (Fig. 38B).

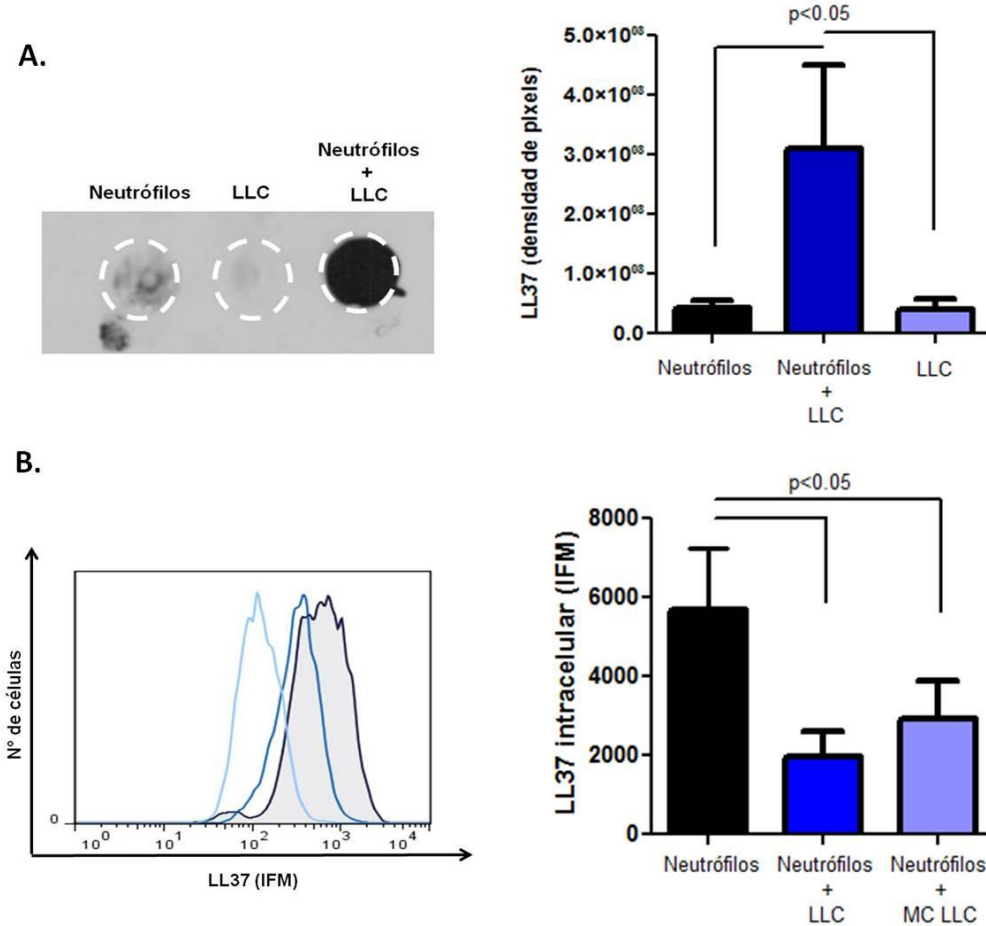


Figura 38. Secreción de LL37 por parte de neutrófilos inducida por células LLC.
A- Neutrófilos de DS ($2 \times 10^6/\text{ml}$) fueron co-cultivados o no en presencia de células LLC (también fueron cultivadas las células LLC solas), los sobrenadantes fueron colectados luego de 24hs y se analizó la presencia del LL37 en los mismos por dot blots (Se ilustra un experimento representativo). Se cuantificó el número de pixeles para cada condición usando el software Imagequant LAS 4000. Se muestran las medias \pm SEM en cada condición ($n=5$). **B-** Se evaluó por citometría de flujo el contenido intracelular de LL37 en neutrófilos de DS cultivados solos (histograma relleno), cultivados con medio condicionado LLC (histograma vacío azul) o cultivados con células LLC (histograma vacío celeste). Se representa la cuantificación expresada como media \pm SEM de la IFM del LL37 intracelular en cada condición ($n=5$). En ambos casos la significancia estadística se obtuvo mediante el test de Friedman seguido por el postest de Dunn's.

Los resultados del dot blot demuestran que la concentración de LL37 en los sobrenadantes de los co-cultivos es mayor que en los sobrenadantes correspondientes a los tipos celulares individuales. Por otro lado, al analizar el contenido intracelular de LL37

en neutrófilos mediante citometría de flujo se observó que tanto en presencia del medio condicionado LLC como en presencia de células LLC el contenido intracelular del péptido es menor respecto al control. Aunque no es estadísticamente significativo hasta el momento, la concentración de LL37 intracelular en los neutrófilos parecería ser menor cuando hay contacto con las células leucémicas que cuando son cultivados con el medio condicionado. En cualquier caso, los resultados evidencian que las células LLC promueven la secreción de LL37 por parte de los neutrófilos.

Discusión.

Papel de las NETs en LLC.

A pesar de la importancia de los neutrófilos en la defensa del huésped contra las infecciones bacterianas y fúngicas, la comprensión actual de su papel en LLC es incompleta comparada con la caracterización fenotípica y funcional de otras poblaciones celulares inmunológicas. Los recuentos de neutrófilos son generalmente normales o se encuentran ligeramente reducidos en pacientes no tratados, limitándose la neutropenia profunda sólo a aquellos pacientes que cursan con una importante infiltración en la médula ósea como consecuencia de una enfermedad avanzada, o a aquellos pacientes que se encuentran bajo tratamiento con quimioterápicos mielosupresores (159-161). Trabajos previos han reportado funciones defectuosas de los neutrófilos en LLC, particularmente en relación a su actividad microbicida; sin embargo, la información es escasa y contradictoria(44). Para la realización de esta tesis se decidió investigar una función de los neutrófilos que no había sido abordada previamente: la capacidad para formar NETs. Dada la alta recurrencia de infecciones por bacterias capsuladas en los pacientes LLC y la importancia de las NETs como mecanismo microbicida, la hipótesis inicial suponía que los neutrófilos de estos pacientes mostrarían deficiencias en la liberación de NETs. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron exactamente lo contrario: los neutrófilos de pacientes LLC exhiben una capacidad incrementada para formar NETs en comparación con neutrófilos de dadores sanos cuando son estimulados *in vitro*. Esta capacidad diferencial no solo se observó al estimular a los neutrófilos con un potente inductor farmacológico como el PMA, sino también cuando se emplearon estímulos fisiológicos tales como TNF- α + LPS.

La capacidad incrementada de formar NETs no se limita solamente a los neutrófilos de los pacientes LLC ya que ha sido reportada también en pacientes con patologías autoinmunes, como artritis reumatoidea (162), y recientemente en individuos con diabetes tipo 1 y 2 (163). La causa subyacente a esta mayor capacidad de formar NETs no se conoce completamente y parece ser particular para cada condición patológica, por ejemplo, altas concentraciones séricas de glucosa en diabetes. En dicho contexto se ha reportado que la hiperglucemia incrementa tanto la expresión como la actividad de la enzima PAD4, que es la encargada de citrulinar las histonas, siendo este proceso esencial para la formación de las NETs (163). Adicionalmente, se ha reportado que en ciertos modelos murinos de cáncer el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF de sus siglas en inglés) secretado por las células tumorales induce la formación de NETs lo que contribuye al estado protrombótico observado en cáncer (89). De hecho, las NETs son esenciales para la trombosis en muchos contextos ya que sirven como andamios estructurales para el atrapamiento y la agregación de plaquetas y eritrocitos (164). El tromboembolismo venoso es una complicación relativamente frecuente en pacientes LLC (165, 166). Es posible que la susceptibilidad incrementada para formar NETs de sus neutrófilos contribuya, al menos en parte, al alto riesgo de eventos trombóticos en esta patología.

Para la mayoría de los estímulos, incluyendo PMA y citoquinas, la formación de NETs depende de la generación de IROs a través de la activación de la NADPH oxidasa (167). Los IROs favorecen la liberación de la elastasa y de la MPO desde los gránulos azurófilos hacia el citoplasma permitiendo la translocación de estas enzimas al núcleo. Una vez en el núcleo, la elastasa degrada parcialmente las histonas y la MPO facilita la descondensación de la cromatina, conduciendo a la extrusión de las NETs (168). En nuestros experimentos no encontramos diferencias en los niveles de IROs producidos

en respuesta a la estimulación por PMA entre neutrófilos de pacientes LLC y de dadores sanos, lo cual es coincidente con lo reportado previamente (169). Tampoco encontramos diferencias en la actividad de elastasa o de MPO que pueda explicar la capacidad incrementada para formar NETs de los neutrófilos de los pacientes LLC. Como mencionamos anteriormente, otra enzima relevante para que el proceso NETótico tenga lugar es la PAD4. Esta enzima induce la deaminación de las argininas presentes en las histonas generando citrulinas y favoreciendo de esta forma la descondensación de la cromatina. La evaluación de los niveles de esta enzima en neutrófilos no ha sido aún evaluada en el contexto de la LLC, siendo su estudio una perspectiva relevante a futuro para un mejor entendimiento de la NETosis en LLC.

Dado que una variedad de citoquinas, factores de crecimiento o condiciones extrínsecas tales como las anteriormente descritas (altos niveles de glucosa, G-CSF entre otras) aumentan la susceptibilidad de neutrófilos a liberar NETs, buscamos factores solubles en el plasma de pacientes LLC capaces de primar a los neutrófilos. Logramos identificar a la IL-8 como uno de estos factores. Tal como había sido reportado anteriormente (148, 170), encontramos que los niveles plasmáticos de IL-8 se encontraban significativamente incrementados en la mayoría de los pacientes LLC de nuestra cohorte, en relación a los niveles de IL-8 en plasma de dadores sanos de edad comparable. Asimismo observamos que la disminución de estos niveles reducía la capacidad de los plasmas de pacientes LLC para sensibilizar a los neutrófilos de dadores sanos a que liberen NETs. Es decir que los niveles plasmáticos de IL-8 correlacionaron de manera directa con los niveles de NETs producidos *in vitro* por cada paciente.

Otro hallazgo relevante que resalta el papel de la IL-8 en la sensibilización de los neutrófilos a formar NETs fue haber encontrado una clara correlación positiva entre los niveles plasmáticos de IL-8 y la capacidad de los neutrófilos a la NETosis. Dado que está

reportado que los niveles de IL-8 son mayores en plasmas de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (14), determinamos si existía una asociación entre el estadio Binet de los pacientes y el nivel de NETs *in vitro*. Si bien no pudimos hallar una asociación estadísticamente significativa debido, probablemente, al bajo número de muestras de pacientes en estadios avanzados (Binet B y C), se observó que los neutrófilos de pacientes pertenecientes a estos grupos presentan una tendencia a mayor capacidad formadora de NETs. Será preciso incrementar el tamaño de la muestra para confirmar o no esta asociación. Por último, también observamos que los pacientes LLC exhiben una mayor concentración de ADN libre en el plasma respecto a los dadores sanos, y particularmente aquellos pacientes en riesgo de progresión según los marcadores biológicos CD38/CD49d son los que poseen las concentraciones mayores. En futuros estudios determinaremos si este ADN se trata efectivamente de NETs o de una fuente alternativa como las propias células B leucémicas.

En conjunto, estos resultados indican que los niveles incrementados de IL-8 en el plasma de los pacientes LLC juegan un papel importante en la sensibilización de los neutrófilos a la NETosis. ¿Cuál es la fuente principal de IL-8 en LLC? Si bien son muchas las células con capacidad para secretar IL-8, entre otras: células epiteliales, neutrófilos y células endoteliales, son los monocitos y macrófagos los que presentan una capacidad exacerbada para producir esta quimiocina. En pacientes LLC los monocitos no sólo están incrementados en número en la circulación (171), sino que además son reclutados a los tejidos linfáticos por las propias células leucémicas a través de la secreción de CCL3 y CCL4 (172). En los tejidos se diferencian a un tipo particular de macrófago denominado célula de estirpe nodriza o *nurse-like cells*. En los estadios más avanzados de la enfermedad, aumenta el número de células mieloides CD68⁺ (marcador de macrófagos) en los tejidos linfáticos(173), incrementándose en forma paralela los niveles de IL-8

plasmática, lo que sugiere que estas células constituyen la principal fuente de IL-8 en los pacientes LLC.

Un hallazgo relevante de nuestro estudio fueron los efectos positivos ejercidos por las NETs sobre las células leucémicas los cuales condujeron a un retraso en la apoptosis espontánea *in vitro* y a un incremento en la expresión de marcadores de activación. Cabe resaltar que las NETs no exhiben los mismos efectos sobre las células B normales.

Se han reportado efectos tanto estimulantes como deletéreos de las NETs dependiendo del modelo experimental analizado. El daño endotelial inducido por NETs se observó *in vitro* (146) e *in vivo* (174), aunque el mecanismo responsable de la citotoxicidad sigue siendo incierto. Se demostró que la red de ADN que forma las NETs debe permanecer intacta, ya que la degradación de las NETs con ADNsas protege a las células endoteliales de la muerte. Estos resultados sugieren que las proteasas y péptidos antimicrobianos no son suficientes para inducir daño a menos que sean concentrados por la red de cromatina (146). En lugar de inducir la muerte celular, la exposición de células dendríticas plasmacitoides a NETs actúa como un potente inductor de la producción de INF α como consecuencia de la interacción del ADN de las NETs con el TLR-9(83). En aterosclerosis, las NETs priman a los macrófagos para la liberación de IL-1 β frente a la activación con cristales de colesterol. En este caso, no solo se requiere el ADN sino también los ligandos de TLR-2 y TLR-4 presentes en las NETs para la óptima producción de IL-1 β (175). Aunque actualmente no sabemos a través de qué receptor(es) las células leucémicas reconocen a las NETs, datos preliminares aún por confirmar indican que la degradación del ADN no elimina los efectos inhibidores de la apoptosis ejercidos por las NETs sobre las células LLC, sugiriendo que el TLR-9 y los receptores citoplasmáticos de ADN no estarían involucrados.

Las NETs fueron descritas inicialmente como un eficiente mecanismo microbicida capaz de capturar y destruir patógenos extracelulares, por lo cual la capacidad incrementada de los neutrófilos LLC de liberar NETs debería contribuir a una erradicación rápida y eficiente de las bacterias. Sin embargo, éste no parece ser el caso ya que las infecciones siguen siendo la mayor causa de morbi-mortalidad de los pacientes LLC, en particular las provocadas por bacterias capsuladas que afectan el tracto respiratorio (161, 176). Una explicación posible para entender estos resultados aparentemente contradictorios es que la formación de NETs en un tejido puede ser perjudicial en lugar de beneficiosa, como se demostró en la neumonía bacteriana secundaria a la infección por virus influenza (177) y, recientemente, en la enfermedad del tracto respiratorio inferior causada por el virus sincicial respiratorio(178). En estos casos, la abundante liberación de NETs contribuye a la inflamación y a la obstrucción de las vías respiratorias aumentando la susceptibilidad de la mucosa respiratoria a la infección. Es posible que la capacidad incrementada de los neutrófilos de pacientes LLC para liberar NETs juegue un papel perjudicial durante las recurrentes infecciones bacterianas que padecen estos pacientes.

En la actualidad está claro que las NETs ejercen efectos protectores o dañinos, dependiendo de su concentración, del lugar donde se forman y de la capacidad del organismo para eliminarlos adecuadamente. De hecho, la persistencia de las NETs puede representar una fuente de autoantígenos y moléculas inmunoestimuladoras que pueden estar involucradas en el desarrollo de muchas enfermedades autoinmunes. En relación a las NETs como fuente de autoantígenos en el contexto de la LLC, cabe recordar que los receptores para el antígeno (BCR) de las células B leucémicas son autorreactivos y polirreactivos en una gran proporción de los pacientes. Más aún, se ha demostrado que aún aquellos clones B que han perdido su autorreactividad por mutaciones somáticas (IgVH mutados) provienen de secuencias germinales autorreactivas, lo que indica que el

reconocimiento a través del BCR de autoantígenos es un hecho relevante en la iniciación de la LLC. Los neutrófilos, al generar NETs, dejan al descubierto una multiplicidad de autoantígenos y al menos algunos de ellos, como por ejemplo histonas, actina o ADN, pueden ser reconocidos por los BCRs de las células leucémicas. En conjunto estos antecedentes arrojan el interrogante de la posible participación de las NETs en la iniciación y/o progresión de la enfermedad, al menos en una proporción de los pacientes LLC (179). De hecho, en biopsias de bazo de pacientes LLC se han observado NETs en forma de fibras extracelulares de MPO en estrecho contacto con células leucémicas(180). Teniendo en cuenta estas observaciones, parece razonable proponer que los neutrófilos migran a los tejidos linfoides durante las infecciones (o en condiciones de inflamación estéril) en los pacientes LLC siendo propensos a la liberación NETs las cuales podrían favorecer la supervivencia y la activación de células leucémicas.

Diferenciación de neutrófilos circulantes a TANs inducida por las células LLC.

Inicialmente los neutrófilos fueron descriptos como componentes celulares de vida media corta dotados de una variedad de mecanismos microbicidas que los tornan altamente relevantes en la defensa frente a infecciones mediadas por bacterias extracelulares y hongos. Según esta visión tradicional, los neutrófilos circulantes acceden al tejido infectado donde descargan su batería citotóxica y mueren pocas horas después. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que, en individuos con cáncer, los neutrófilos pueden ser reprogramados modificando su fenotipo dentro del microambiente tumoral dando origen a los denominados TANs [36]. Uno de los eventos claves que debe tener lugar para permitir la reprogramación de los neutrófilos a TANs es el incremento de su vida media. Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar si las células leucémicas eran capaces de retrasar la apoptosis de los neutrófilos en cultivo. Observamos que en presencia de células LLC los niveles de apoptosis de neutrófilos de

dadadores sanos resultó significativamente menor que cuando estos se cultivaron solos. De manera adicional, al realizar los co-cultivos separando ambas poblaciones celulares en cámaras de transwell observamos que persistía el efecto inhibidor de la apoptosis mediado por las células LLC, lo que indica que son factores solubles los responsables del mismo. Entre los distintos factores antiapoptóticos que podrían secretar las células LLC decidimos evaluar IL-10 y TGF- β ya que ambos participan de la diferenciación de neutrófilos a TANs [37,38]. En primera instancia analizamos su presencia en los cultivos y se vio que las dos citoquinas se encuentran, en concentraciones comparables, tanto en los sobrenadantes de los co-cultivos como en los sobrenadantes de las células leucémicas incubadas solas, lo que indica que son las células tumorales las que las secretan. Cuando se depletaron los sobrenadantes de una o ambas citoquinas se observó que el efecto antiapoptótico sobre los neutrófilos persistía, lo que indica que el mismo se debe a la presencia de otros factores solubles distintos a IL-10 o TGF- β . Entre los candidatos más probables se encuentra el GM-SCF que es una citoquina clave para prolongar la supervivencia de los neutrófilos en los tejidos (181) y que es producida por las células del clon leucémico(182).

La mayor parte de las evidencias sobre los TANs se obtuvieron trabajando con tumores sólidos. Sin embargo, recientemente Gätjen y colaboradores [37] han reportado la generación de neutrófilos con un perfil protumoral en el bazo de ratones E μ -TCL1, modelo murino de LLC agresiva. En dicho trabajo se describe que los neutrófilos de la zona marginal del bazo tienen un perfil de expresión génica diferente respecto del de los neutrófilos circulantes, estando entre los genes con expresión diferencial algunos ligados a la regulación de la apoptosis. Particularmente el gen que codifica a la proteína antiapoptótica Bfl-1, miembro de la familia Bcl-2, lo que es relevante dado que solo se reporta incrementada en los neutrófilos diferenciados a TANs y no en células mieloides

supresoras. Con la finalidad de determinar si el efecto antiapoptótico mediado por las células LLC sobre los neutrófilos se asocia con un aumento en Bfl-1 analizamos su expresión por western blot en neutrófilos de dadores sanos estimulados durante 24 horas con medio condicionado LLC. Los resultados obtenidos demostraron que los neutrófilos expuestos al medio condicionado de células LLC expresan mayores niveles de Bfl-1 que los neutrófilos controles.

Los resultados que acaban de ser discutidos indican que las células LLC prolongan la sobrevivencia de los neutrófilos a través de factores solubles, pero no demuestran que favorecen su reprogramación a TANs. Con el objetivo de investigar este punto, decidimos evaluar la expresión de marcadores de superficie relacionados con la reprogramación a TANs en neutrófilos expuestos a medios condicionados de células LLC. Entre los marcadores reportados, focalizamos nuestra atención en la expresión de las moléculas CD16 y CD62L, dado que Gätjen y colaboradores, describieron que los neutrófilos esplénicos de ratones E μ -TCL1 en estadios avanzados de la leucemia modulan la expresión de ambas moléculas de manera dependiente de IL-10 y TGF- β [37]. Los resultados obtenidos mostraron que efectivamente el cultivo con medio condicionado LLC aumenta el porcentaje de neutrófilos viables que expresan altos niveles de CD16 (CD16^{High}) y niveles intermedios de CD62L (CD62L^{dim}). Cuando se depletan las citoquinas del medio condicionado no se observan cambios en la expresión de estos marcadores, sugiriendo que, al igual que en el modelo murino, IL-10 y TGF- β son fundamentales para la reprogramación de los neutrófilos.

Es interesante resaltar que la población de neutrófilos CD16^{high} CD62L^{dim} se ha reportado anteriormente en humanos, por ejemplo en individuos que cursan con inflamación sistémica aguda inducida por endotoxina o por trauma severo(183). *In vitro*, estos neutrófilos inhiben la activación de los linfocitos T a través de la liberación de H₂O₂ en la

sinapsis inmunológica. Muy recientemente, esta población de neutrófilos se encontró aumentada en sangre periférica de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (184). En este trabajo también se resaltan dos hallazgos relevantes en relación al presente trabajo de tesis. Por un lado, los autores reportan que los neutrófilos CD16^{high} CD62L^{dim} se encuentran sensibilizados para responder a la IL-8 migrando más rápidamente hacia el tejido tumoral. Por otro lado, muestran que estos neutrófilos producen mayores niveles de NETs que los neutrófilos de fenotipo estándar, pero a diferencia de lo que ocurre en LLC, las NETs serían perjudiciales para el crecimiento tumoral. De hecho, encuentran una correlación positiva entre neutrófilos CD16^{high} CD62L^{dim} y sobrevida en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Teniendo en cuenta el rol protumoral de las NETs en el marco de la LLC, la diferenciación de los neutrófilos al subgrupo CD16^{high} CD62L^{dim} podría correlacionar con peor pronóstico para los pacientes LLC. Un objetivo a futuro será determinar el fenotipo de los neutrófilos en muestras de pacientes LLC en distintos estadios de la enfermedad y analizar su valor como marcador de progresión tumoral.

El péptido LL37 como señal protumoral en el microambiente tumoral LLC.

La tercera parte del presente trabajo de tesis se centró en el estudio del péptido antimicrobiano LL37. Como se mencionara en la Introducción, el LL37 es el único miembro de la familia de las catelicidinas presente en el hombre y, además de su conocido papel antimicrobiano, ejerce múltiples actividades inmunoregulatorias, siendo capaz también de favorecer o bloquear el crecimiento tumoral dependiendo del modelo. Nosotros encontramos que la incubación de las células leucémicas con distintas concentraciones de LL37 recombinante inhibe la apoptosis de las mismas tanto espontánea como inducida por fludarabina. Este fenómeno se asocia con un incremento en la expresión de BCL-2 y un descenso en la activación por clivaje de caspasa-3. Estudios previos describieron efectos antiapoptóticos del LL37 sobre neutrófilos a través

del receptor de péptidos formilados de tipo I (FPRL1) y del receptor de purinas P2X7 (131). En nuestros ensayos el bloqueo de estos receptores no modificó el efecto antiapoptótico del LL37 lo que indicaría que los mismos no están involucrados.

Como siguiente paso, evaluamos el rol de CXCR4, receptor para la quimiocina CXCL12, como molécula de reconocimiento de LL37 en las células LLC. Esta interacción fue descrita previamente para el caso de precursores hematopoyéticos de médula ósea donde se demostró que el LL37 incrementaba la migración de estos precursores a CXCL12 (136). Al analizar la respuesta quimiotáctica de las células LLC hacia CXCL12 observamos que era mayor en presencia de LL37 tal como ocurre con los precursores hematopoyéticos. Si bien encontramos el mismo efecto biológico, parecería que el mecanismo de acción es diferente. En el caso de los precursores hematopoyéticos el LL37 potencia la señalización a través de CXCR4 favoreciendo la formación de balsas lipídicas (*lipid rafts*), no por contacto directo si no como consecuencia de la distorsión de la membrana plasmática inducida por el péptido(136). En cambio, en el caso de las células leucémicas nosotros observamos por microscopía confocal la colocalización del LL37 con el CXCR4. Por otro lado, encontramos que el péptido induce la internalización del CXCR4, lo que sugiere que el LL37 y el CXCR4, en nuestro caso, interactúan de manera directa. Finalmente se evaluó si el efecto antiapoptótico del LL37 era consecuencia de su interacción con CXCR4 utilizando un anticuerpo bloqueante específico para el receptor. Observamos que las células leucémicas expuestas a LL37 en presencia del anticuerpo anti-CXCR4 durante 24 horas presentan niveles de muerte comparables al control sin LL37, lo que demuestra que CXCR4 es la molécula clave para que el péptido ejerza su efecto antiapoptótico en las células LLC. El CXCR4 es un receptor crucial para las células leucémicas, ya que favorece su migración a los órganos linfáticos secundarios en donde reciben múltiples señales tróficas que aumentan su

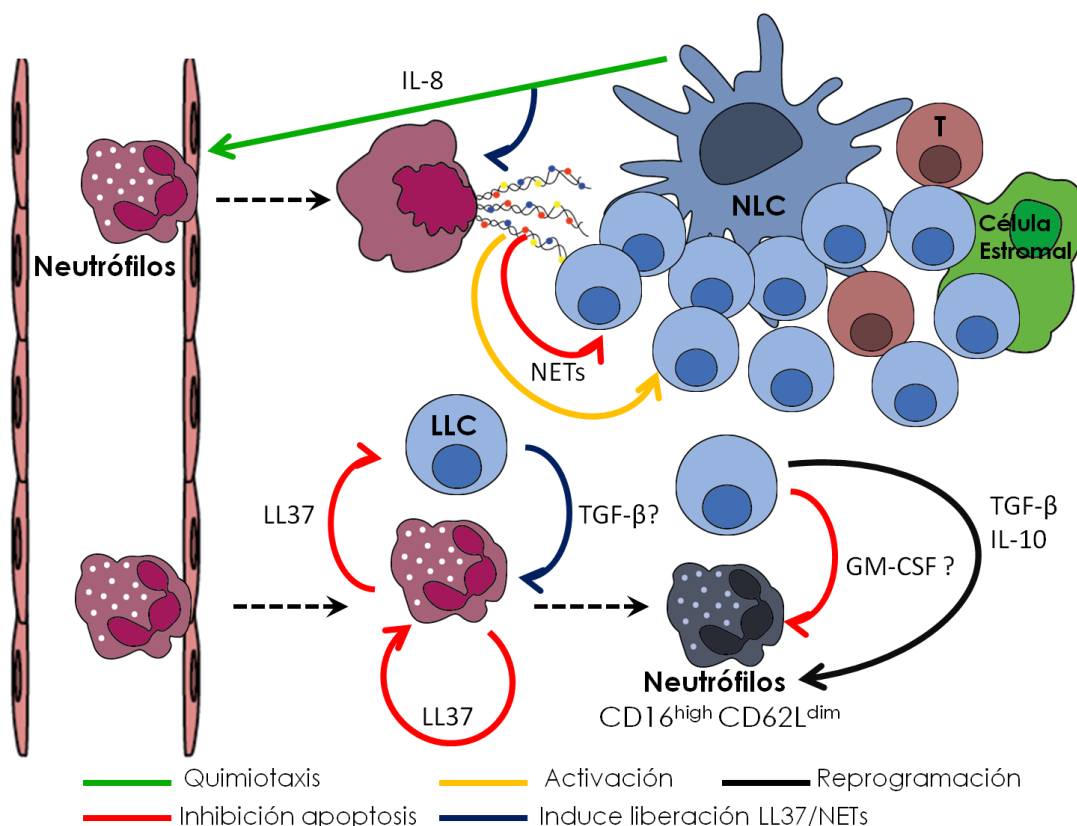
activación y supervivencia promoviendo el desarrollo de la leucemia. Nuestros hallazgos resultan relevantes dado que el LL37 además de brindar por sí mismo señales antiapoptóticas a las células leucémicas a través de CXCR4, incrementa la respuesta migratoria a CXCL12 lo que podría favorecer la migración de las células LLC a sus nichos de supervivencia.

En muchas ocasiones un incremento de la viabilidad celular de las células leucémicas se asocia con un aumento en el estado de activación de las mismas, por lo cual estudiamos si el péptido LL37 era capaz de inducir la activación de las células LLC evaluando la expresión de CD80, CD86, HLA-DR y CD69. Se encontró que el péptido *per se* no tuvo efecto alguno sobre la expresión de estos marcadores de activación en las células LLC. Investigamos entonces si el LL37 podía actuar como un factor coestimulante. Previamente se ha reportado que el LL37 potencia la activación celular inducida por ADN a través de mecanismos dependientes e independientes del TLR-9 (151, 185). Por ejemplo, en el caso de las células dendríticas plasmacitoides de pacientes con psoriasis, el LL37 forma complejos con el ADN promoviendo su captura e interacción con TLR-9 y estimulando la producción de IFN de tipo I. Por otra parte, el LL37 transporta de manera eficiente el ADN al citoplasma de monocitos normales induciendo la activación celular a través de sensores de ADN citosólicos como STING. Teniendo en cuenta estos antecedentes investigamos la respuesta de las células LLC a ADN-CpG complejado con LL37. Se encontró mayor expresión de los marcadores de activación CD86 y HLA-DR en células leucémicas expuestas al complejo en comparación a ADN-CpG solo. Por otra parte, la internalización de ADN-CpG marcado con FITC es más rápida cuando se encuentra complejado con LL37. Estos resultados son altamente relevantes en el marco de la LLC dado que si se tiene en cuenta la mayor capacidad para formar NETs de los neutrófilos de estos pacientes, los altos niveles de ADN en circulación como así también la frecuencia de

infecciones bacterianas, se incrementa la probabilidad de que las células leucémicas se encuentren y sean estimuladas con complejos ADN-LL37.

Como se mencionara previamente, en el contexto del microambiente tumoral, los macrófagos asociados a tumor son propuestos como la principal fuente de LL37, estando su expresión y secreción moduladas por las células tumorales(153). Por otro lado, a pesar de su abundancia en los infiltrados tumorales y la alta expresión de LL37, no existen estudios que postulen a los neutrófilos como fuente de LL37 en el microambiente tumoral, posiblemente debido a que la liberación de LL37 por parte de los neutrófilos se asume como una respuesta inmediata a un estímulo inductor de la degranulación. En esta tesis se analizó la presencia de LL37 en sobrenadantes de co-cultivos entre células B leucémicas y neutrófilos para determinar si estos últimos podían secretar LL37 al medio. Los resultados demostraron que LL37 está efectivamente presente en los sobrenadantes del co-cultivo, no así en los sobrenadantes de las células LLC o de los neutrófilos cultivados en forma separada. Más interesante aún, encontramos que los niveles intracelulares de LL37 en neutrófilos co-cultivados con células LLC o medio condicionado de las mismas era significativamente menor comparado con lo que expresan los neutrófilos cultivados en forma aislada. Estos resultados sugieren que las células leucémicas son capaces de inducir la secreción de LL37 por parte de neutrófilos tanto de una manera dependiente de contacto como a través de factores solubles, siendo esta última menos eficiente. Este no sería el primer caso en el que las células tumorales son capaces de mediar la secreción de LL37 a través de factores solubles. Un reporte previo en el marco del linfoma de Burkitt (141) demostró que las células malignas inducen la secreción de LL37 por parte de los macrófagos asociados a tumor, ejerciendo el péptido una actividad antitumoral. Queda para el futuro investigar si los macrófagos o células tipo nodriza también son inducidos a secretar LL37 por parte de las células leucémicas.

Las células LLC son capaces de inducir, en los tejidos linfáticos, la diferenciación de monocitos en NLC, las cuales son muy buenas productoras de IL-8, cuya función principal es el reclutamiento de neutrófilos. Es posible que aquellos neutrófilos que migren en respuesta a la IL-8 sean reprogramados por la acción de diferentes factores secretados por las células leucémicas en los tejidos linfáticos (IL-10, TGF- β , GM-CSF) incrementando su viabilidad y adquiriendo un fenotipo protumoral (CD16^{high} CD62L^{dim}). Ante ciertos estímulos, estos neutrófilos podrán liberar NETs y/o LL37, ambas promotoras de la viabilidad de las células leucémicas. ¿Podrían ser los neutrófilos jugadores relevantes en el microambiente tumoral? Aun no lo sabemos, para ello será necesario corroborar nuestros resultados en muestras de tejidos linfáticos de pacientes LLC, siendo particularmente interesante, la evaluación en muestras de bazo. En el siguiente modelo se resume lo previamente expuesto resaltando particularmente las nuevas interacciones descritas en este trabajo de tesis doctoral.



CONCLUSIONES.

A lo largo de esta tesis doctoral se han descrito varios aspectos novedosos de una interacción celular poco estudiada en el marco de la leucemia linfática crónica. Hemos demostrado que:

- Los neutrófilos de los pacientes LLC exhiben una capacidad incrementada para formar NETs respecto a neutrófilos de dadores sanos.
- La elevada concentración de IL-8 plasmática es la responsable, al menos en parte, de esta mayor capacidad de los neutrófilos para liberar NETs.
- Las NETs inducen la activación y retardan la apoptosis de las células leucémicas.
- Las células LLC prolongan la sobrevida de los neutrófilos e inducen su reprogramación fenotípica a través de factores solubles.
- El péptido antimicrobiano LL37 aumenta la respuesta quimiotáctica a CXCL12 y la sobrevida de las células leucémicas actuando sobre CXCR4.
- Las células leucémicas son capaces de inducir la secreción de LL37 por parte de los neutrófilos a través de señales de contacto célula-célula y de factores solubles.

En conjunto nuestros resultados revelan la existencia de un diálogo recíproco entre neutrófilos y células B leucémicas en LLC. Estas últimas a través de factores solubles promueven la sobrevida y reprogramación de los neutrófilos que, a su vez, inhiben la apoptosis de las células B malignas mediante la formación de NETs y la secreción de LL37. En este trabajo de tesis se describe por primera vez la diferenciación de los neutrófilos a TANs en una neoplasia hematológica humana. Los resultados obtenidos alientan el estudio de los neutrófilos como así también de componentes de las NETs, en particular del péptido LL37, como potenciales marcadores pronósticos o blancos terapéuticos complementarios a las terapias actuales.

.....
Lic. Enrique Podaza

Doctorando

.....
Dra. Mirta Giordano

Directora

.....
Dr. Angel Alonso

Consejero de estudios

Bibliografía.

1. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1017-29.
2. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annual review of immunology*. 2003;21:841-94.
3. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2003;153-75.
4. Payelle-Brogard B, Magnac C, Alcover A, Roux P, Dighiero G. Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2002;118(4):976-85.
5. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):859-61.
6. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2005;104(10):2124-32.
7. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005;90(3):391-9.
8. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
9. Binet JL, Leparrier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977;40(2):855-64.
10. Mongini PK, Gupta R, Boyle E, Nieto J, Lee H, Stein J, et al. TLR-9 and IL-15 Synergy Promotes the In Vitro Clonal Expansion of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *Journal of immunology*. 2015;195(3):901-23.
11. Damle RN. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen experienced B lymphocytes. 2002.
12. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. 2004;104(8):2499-504.
13. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(4):519-25.
14. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(7):1008-16.
15. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. 2006;33(2):150-6.
16. Hamblin. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of CLL. 1999.
17. Hamblin. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in CLL, but CD38 expression may vary during the course of the disease 2002.
18. Hamblin. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. 2000.
19. Damle RN. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in CLL. 1999.
20. Ghia P. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of CLL patients at risk of disease progression. 2003.
21. Mehta. CD38, a cell surface protein with multiple functions 1996.
22. Deaglio S. Human CD38 ligand. A 120 KDA protein predominantly expressed on endothelial cells 1996.

23. Zucchetto A, Vaisitti T, Benedetti D, Tissino E, Bertagnolo V, Rossi D, et al. The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(6):1301-12.
24. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, et al. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British journal of haematology*. 2008;140(5):537-46.
25. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, et al. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2008;93(10):1575-9.
26. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(9):897-904.
27. Kipps TJ. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematology and cell therapy*. 1997;39 Suppl 1:S17-27.
28. Robertson LE, Plunkett W. Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 1993;11 Suppl 2:71-4.
29. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91(9):3379-89.
30. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*. 1967;29(4):Suppl:566-84.
31. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(11):1639-47.
32. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*. 2004;103(2):375-82.
33. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(1):399-408.
34. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Current topics in microbiology and immunology*. 2005;294:135-45.
35. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2003;123(3):380-8.
36. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):755-64.
37. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(3):401-13.
38. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012-20.
39. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PloS one*. 2013;8(3):e60370.
40. Morrison VA. Infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia: pathogenesis, spectrum of infection, and approaches to prophylaxis. *Clinical lymphoma & myeloma*. 2009;9(5):365-70.
41. Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2008:450-6.
42. Fust G, Miszlai Z, Czink E, Varga L, Paloczi K, Szegedi G, et al. C1 and C4 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia and their significance. *Immunology letters*. 1987;14(3):255-9.

43. Middleton O, Cosimo E, Dobbin E, McCaig AM, Clarke C, Brant AM, et al. Complement deficiencies limit CD20 monoclonal antibody treatment efficacy in CLL. *Leukemia*. 2015;29(1):107-14.
44. Kontoyiannis DP, Georgiadou SP, Wierda WG, Wright S, Albert ND, Ferrajoli A, et al. Impaired bactericidal but not fungicidal activity of polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(8):1730-3.
45. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertonecelli L, Martinelli S, Guarnotta C, et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*. 2013;98(7):1115-23.
46. Jurado-Camino T, Cordoba R, Esteban-Burgos L, Hernandez-Jimenez E, Toledano V, Hernandez-Rivas JA, et al. Chronic lymphocytic leukemia: a paradigm of innate immune cross-tolerance. *Journal of immunology*. 2015;194(2):719-27.
47. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in cancer biology*. 2014;24:71-81.
48. Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez-Garcia E, Payer AR, et al. Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS one*. 2014;9(10):e108326.
49. Pourghesari B, Bruton R, Parry H, Billingham L, Fegan C, Murray J, et al. The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire. *Blood*. 2010;116(16):2968-74.
50. Chiorazzi N, Fu SM, Montazeri G, Kunkel HG, Rai K, Gee T. T cell helper defect in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of immunology*. 1979;122(3):1087-90.
51. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(7):1797-805.
52. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2427-37.
53. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012;120(7):1412-21.
54. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-4.
55. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(10):2281-92.
56. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature immunology*. 2011;12(6):492-9.
57. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology*. 2009;10(1):29-37.
58. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.
59. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*. 2001;2(3):261-8.
60. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013;121(9):1612-21.
61. Brusa D, Serra S, Coscia M, Rossi D, D'Arena G, Laurenti L, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):953-63.
62. Sinisalo M, Aittoniemi J, Koski T, Tobin G, Thunberg U, Sundstrom C, et al. Similar humoral immunity parameters in chronic lymphocytic leukemia patients independent of VH gene mutation status. *Leukemia & lymphoma*. 2004;45(12):2451-4.

63. Rossi D, Sozzi E, Puma A, De Paoli L, Rasi S, Spina V, et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *British journal of haematology*. 2009;146(1):64-75.
64. Rozman C, Montserrat E, Vinolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer*. 1988;61(2):279-83.
65. Jurlander J, Geisler CH, Hansen MM. Treatment of hypogammaglobulinaemia in chronic lymphocytic leukaemia by low-dose intravenous gammaglobulin. *European journal of haematology*. 1994;53(2):114-8.
66. Rossi D, De Paoli L, Rossi FM, Cerri M, Deambrogi C, Rasi S, et al. Early stage chronic lymphocytic leukaemia carrying unmutated IGHV genes is at risk of recurrent infections during watch and wait. *British journal of haematology*. 2008;141(5):734-6.
67. Francis S, Karanth M, Pratt G, Starczynski J, Hooper L, Fegan C, et al. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;107(5):1023-33.
68. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(4):377-94.
69. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic research*. 2009;43(1-3):25-61.
70. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*. 2005;23:197-223.
71. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free radical biology & medicine*. 2007;42(2):153-64.
72. Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? Current opinion in microbiology. 2004;7(1):62-6.
73. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
74. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-41.
75. Vorobjeva NV, Pinegin BV. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry Biokhimiia*. 2014;79(12):1286-96.
76. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *Journal of immunology*. 2012;189(6):2689-95.
77. Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(2):189-201.
78. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout. *PloS one*. 2011;6(12):e29318.
79. Arai Y, Nishinaka Y, Arai T, Morita M, Mizugishi K, Adachi S, et al. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;443(2):556-61.
80. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of cell biology*. 2009;184(2):205-13.
81. Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Frontiers in immunology*. 2012;3:385.
82. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9813-8.
83. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*. 2011;3(73):73ra19.
84. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1beta-mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75(1):269-77.

85. Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, Bonderup OK, Glerup H, Bogsted M, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(9):2052-67.
86. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta diabetologica*. 2015;52(3):497-503.
87. Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Frontiers in immunology*. 2013;4:1.
88. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *The Journal of pathology*. 2014;233(3):294-307.
89. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(32):13076-81.
90. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer research*. 2016;76(6):1367-80.
91. Ramirez GA, Manfredi AA, Rovere-Querini P, Maugeri N. Bet on NETs! Or on How to Translate Basic Science into Clinical Practice. *Frontiers in immunology*. 2016;7:417.
92. Flow cytometric quantification of neutrophil extracellular traps: Limitations of the methodological approach. *American journal of hematology*. 2016;91(9):965.
93. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *Journal of immunology*. 2013;191(10):4895-901.
94. Reyes-Castillo Z, Palafox-Sanchez CA, Parra-Rojas I, Martinez-Bonilla GE, del Toro-Arreola S, Ramirez-Duenas MG, et al. Comparative analysis of autoantibodies targeting peptidylarginine deiminase type 4, mutated citrullinated vimentin and cyclic citrullinated peptides in rheumatoid arthritis: associations with cytokine profiles, clinical and genetic features. *Clinical and experimental immunology*. 2015;182(2):119-31.
95. Granot Z, Fridlender ZG. Plasticity beyond cancer cells and the "immunosuppressive switch". *Cancer research*. 2015;75(21):4441-5.
96. Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, et al. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer research*. 2003;63(6):1405-12.
97. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(28):4709-17.
98. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *International journal of cancer*. 2011;129(9):2183-93.
99. Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(6):e98259.
100. Tabaries S, Ouellet V, Hsu BE, Annis MG, Rose AA, Meunier L, et al. Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. *Breast cancer research : BCR*. 2015;17:45.
101. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. 2015;528(7582):413-7.
102. Tazzyman S, Niaz H, Murdoch C. Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: subversion of immune responses to promote tumour growth. *Seminars in cancer biology*. 2013;23(3):149-58.
103. Ishihara Y, Fujii T, Iijima H, Saito K, Matsunaga K. The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis: suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier (PSK). *In vivo*. 1998;12(2):175-82.
104. Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer cell*. 2011;20(3):300-14.

105. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
106. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;16(3):183-94.
107. Andzinski L, Kasnitz N, Stahnke S, Wu CF, Gereke M, von Kockritz-Blickwede M, et al. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *International journal of cancer*. 2016;138(8):1982-93.
108. Shaul ME, Levy L, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Kapoor V, et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFbeta modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology*. 2016;5(11):e1232221.
109. Lopez-Lago MA, Posner S, Thodima VJ, Molina AM, Motzer RJ, Chaganti RS. Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*. 2013;32(14):1752-60.
110. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell*. 2004;6(5):447-58.
111. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:2400-7.
112. Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013;62(11):1745-56.
113. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2015;8(3):125-58.
114. Fridlender ZG, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Cheng G, Kapoor V, et al. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PloS one*. 2012;7(2):e31524.
115. Benevides L, da Fonseca DM, Donate PB, Tiezzi DG, De Carvalho DD, de Andrade JM, et al. IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer research*. 2015;75(18):3788-99.
116. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522(7556):345-8.
117. Mishalian I, Bayuh R, Eruslanov E, Michaeli J, Levy L, Zolotarov L, et al. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17--a new mechanism of impaired antitumor immunity. *International journal of cancer*. 2014;135(5):1178-86.
118. Medina-Echeverz J, Fioravanti J, Zabala M, Ardaiz N, Prieto J, Berraondo P. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *Journal of immunology*. 2011;186(2):807-15.
119. Spiegel A, Brooks MW, Houshyar S, Reinhardt F, Ardolino M, Fessler E, et al. Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. *Cancer discovery*. 2016;6(6):630-49.
120. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and cell biology*. 2001;79(5):502-6.
121. Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML. Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta neuropathologica*. 1999;98(4):349-54.
122. Reid MD, Basturk O, Thirabanasak D, Hruban RH, Klimstra DS, Bagci P, et al. Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(12):1612-9.
123. Schmidt H, Bastholt L, Geertsens P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, et al. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British journal of cancer*. 2005;93(3):273-8.

124. Caruso RA, Bellocco R, Pagano M, Bertoli G, Rigoli L, Inferrera C. Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2002;15(8):831-7.
125. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunology.* 2010;185(4):2273-84.
126. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular immunology.* 2012;280(1):22-35.
127. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *Journal of immunology.* 2004;172(8):4987-94.
128. van der Does AM, Beekhuizen H, Ravensbergen B, Vos T, Ottenhoff TH, van Dissel JT, et al. LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature. *Journal of immunology.* 2010;185(3):1442-9.
129. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *European journal of immunology.* 2001;31(4):1066-75.
130. Wan M, van der Does AM, Tang X, Lindbom L, Agerberth B, Haeggstrom JZ. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *Journal of leukocyte biology.* 2014;95(6):971-81.
131. Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *Journal of immunology.* 2006;176(5):3044-52.
132. Tjabringa GS, Ninaber DK, Drijfhout JW, Rabe KF, Hiemstra PS. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *International archives of allergy and immunology.* 2006;140(2):103-12.
133. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *Journal of immunology.* 2002;169(7):3883-91.
134. Borge M, Nannini PR, Morande PE, Jancic C, Bistmans A, Bezares RF, et al. CXCL12 is a costimulator for CD4+ T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2013;62(1):113-24.
135. Hutchinson CV, Dyer MJ. Breaking good: the inexorable rise of BTK inhibitors in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology.* 2014;166(1):12-22.
136. Wu W, Kim CH, Liu R, Kucia M, Marlicz W, Greco N, et al. The bone marrow-expressed antimicrobial cationic peptide LL-37 enhances the responsiveness of hematopoietic stem progenitor cells to an SDF-1 gradient and accelerates their engraftment after transplantation. *Leukemia.* 2012;26(4):736-45.
137. Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, Sandstedt B, Borregaard N, Tham E, et al. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *International journal of cancer.* 2005;114(5):713-9.
138. von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D, et al. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung cancer.* 2008;59(1):12-23.
139. Li D, Beisswenger C, Herr C, Schmid RM, Gallo RL, Han G, et al. Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth. *Oncogene.* 2014;33(21):2709-16.
140. Sainz B, Jr., Alcala S, Garcia E, Sanchez-Ripoll Y, Azevedo MM, Cioffi M, et al. Microenvironmental hCAP-18/LL-37 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma by activating its cancer stem cell compartment. *Gut.* 2015;64(12):1921-35.
141. Bruns H, Buttner M, Fabri M, Mougiakakos D, Bittenbring JT, Hoffmann MH, et al. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Science translational medicine.* 2015;7(282):282ra47.
142. Bieth J, Spiess B, Wermuth CG. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochemical medicine.* 1974;11(4):350-7.

143. Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K, Broxmeyer HE. Stromal-cell-derived factor-1/CXCL12-induced chemotaxis of a T cell line involves intracellular signaling through Cbl and Cbl-b and their regulation by Src kinases and CD45. *Blood cells, molecules & diseases*. 2006;36(2):308-14.
144. Patrussi L, Olivieri C, Lucherini OM, Paccani SR, Gamberucci A, Lanfrancione L, et al. p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells. *Blood*. 2007;110(6):1730-8.
145. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging cell*. 2014;13(4):690-8.
146. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS letters*. 2010;584(14):3193-7.
147. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PloS one*. 2012;7(10):e48111.
148. Yan XJ, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(19):5201-10.
149. Kara IO, Sahin B, Gunesacar R. Expression of soluble CD27 and interleukins-8 and -10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease stage and prognosis. *Advances in therapy*. 2007;24(1):29-40.
150. Thalín C, Daleskog M, Goransson SP, Schatzberg D, Lasselin J, Laska AC, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunologic research*. 2017;65(3):706-12.
151. Chamilos G, Gregorio J, Meller S, Lande R, Kontoyiannis DP, Modlin RL, et al. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood*. 2012;120(18):3699-707.
152. Gatjen M, Brand F, Grau M, Gerlach K, Kettritz R, Westermann J, et al. Splenic Marginal Zone Granulocytes Acquire an Accentuated Neutrophil B-Cell Helper Phenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer research*. 2016;76(18):5253-65.
153. Gill K, Mohanti BK, Singh AK, Mishra B, Dey S. The over expression of cathelicidin peptide LL37 in head and neck squamous cell carcinoma: the peptide marker for the prognosis of cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2011;10(3-4):125-34.
154. Li D, Liu W, Wang X, Wu J, Quan W, Yao Y, et al. Cathelicidin, an antimicrobial peptide produced by macrophages, promotes colon cancer by activating the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncotarget*. 2015;6(5):2939-50.
155. Weber G, Chamorro CI, Granath F, Liljegren A, Zreika S, Saidak Z, et al. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(1):R6.
156. Majewski K, Zelechowska P, Brzezinska-Blaszczyk E. Circulating cathelicidin LL-37 in adult patients with pulmonary infectious diseases. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2017;40(1):E34-E9.
157. Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A, et al. P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(2):706-8.
158. Wlasiuk P, Tomczak W, Zajac M, Dmoszynska A, Giannopoulos K. Total expression of HLA-G and TLR-9 in chronic lymphocytic leukemia patients. *Human immunology*. 2013;74(12):1592-7.
159. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: the role for immunotherapy. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(23):3389-98.
160. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *British medical bulletin*. 2008;87:49-62.
161. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best practice & research Clinical haematology*. 2010;23(1):145-53.
162. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(3):R122.

163. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature medicine*. 2015;21(7):815-9.
164. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768-76.
165. Whittle AM, Allsup DJ, Bailey JR. Chronic lymphocytic leukaemia is a risk factor for venous thromboembolism. *Leukemia research*. 2011;35(3):419-21.
166. Simkovic M, Vodarek P, Motyckova M, Belada D, Vrbacky F, Zak P, et al. Venous thromboembolism in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Thrombosis research*. 2015;136(6):1082-6.
167. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(4):513-30.
168. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. 2010;191(3):677-91.
169. Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, Rambaldi A, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood*. 2013;122(20):3482-91.
170. Yoon JY, Lafarge S, Dawe D, Lakhi S, Kumar R, Morales C, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-8 with poor prognosis in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(9):1735-42.
171. Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Abnormal blood monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*. 1988;48(17):4812-6.
172. Zucchetto A, Tripodo C, Benedetti D, Deaglio S, Gaidano G, Del Poeta G, et al. Monocytes/macrophages but not T lymphocytes are the major targets of the CCL3/CCL4 chemokines produced by CD38(+)CD49d(+) chronic lymphocytic leukaemia cells. *British journal of haematology*. 2010;150(1):111-3.
173. Jia L, Clear A, Liu FT, Matthews J, Uddin N, McCarthy A, et al. Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(11):1709-19.
174. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*. 2011;187(1):538-52.
175. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349(6245):316-20.
176. Young JA. Epidemiology and management of infectious complications of contemporary management of chronic leukemias. *Infectious disorders drug targets*. 2011;11(1):3-10.
177. Narayana Moorthy A, Narasaraaju T, Rai P, Perumalsamy R, Tan KB, Wang S, et al. In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. *Frontiers in immunology*. 2013;4:56.
178. Cortjens B, de Boer OJ, de Jong R, Antonis AF, Sabogal Pineros YS, Lutter R, et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *The Journal of pathology*. 2016;238(3):401-11.
179. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1636-43.
180. Sangaletti S, Tripodo C, Vitali C, Portararo P, Guarnotta C, Casalini P, et al. Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma. *Cancer discovery*. 2014;4(1):110-29.
181. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 1992;80(11):2920-4.
182. Harris RJ, Pettitt AR, Schmutz C, Sherrington PD, Zuzel M, Cawley JC, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival factor for mature normal and malignant B lymphocytes. *Journal of immunology*. 2000;164(7):3887-93.
183. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):327-36.

184. Millrud CR, Kagedal A, Kumlien Georen S, Winqvist O, Uddman R, Razavi R, et al. NET-producing CD16^{high} CD62L^{dim} neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC. *International journal of cancer*. 2017;140(11):2557-67.
185. Stephan A, Batinica M, Steiger J, Hartmann P, Zaucke F, Bloch W, et al. LL37:DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages. *Immunology*. 2016;148(4):420-32.